

Función del gen *dRYBP* en *Drosophila melanogaster*

Memoria presentada por Inmaculada González García para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.
Enero 2007

Director de Tesis: Ana de Busturia Jimeno
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)

Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid.

ÍNDICE

Resumen del trabajo en inglés	1
Abreviaturas	2
Introducción	
<i>Drosophila melanogaster</i> , sistema modelo para el estudio de la Biología del Desarrollo	4
Ciclo vital y morfología del cuerpo de <i>Drosophila</i>	4
Generación del patrón morfológico	6
GENES DE SEGMENTACIÓN: FORMACIÓN DE LOS SEGMENTOS	6
GENES HOMEÓTICOS: GENERACIÓN DE LA IDENTIDAD SEGMENTAL	6
El complejo bithorax	7
Dominios cis-reguladores del BX-C	8
Elementos de Respuesta a Polycomb (PREs) y Elementos de Respuesta a trithorax (TREs)	9
Establecimiento de los patrones de expresión de los genes homeóticos	10
Mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos durante el desarrollo	11
LOS GENES DEL GRUPO <i>Polycomb</i> (PcG)	12
COMPLEJOS PROTEICOS DEL PcG	12
LOS GENES DEL GRUPO <i>TRITHORAX</i> (trx-G)	14
COMPLEJOS PROTEICOS trxG	14
CONSERVACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PcG Y trxG EN LA EVOLUCIÓN	15
GRUPO DE GENES ETP ("Enhancer of trithorax and Polycomb")	17
Mecanismos de mantenimiento del estado transcripcional	17
1) RECLUTAMIENTO DE LOS COMPLEJOS PROTEICOS AL ADN	17
2) MODIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA	18
El gen <i>dRYBP</i>	20
Objetivos	22
Materiales y métodos	
1. Cepas de moscas y obtención de moscas transgénicas	23
2. Interacciones genéticas	24
3. Tinción histoquímica con X-Gal (ensayo de la actividad β -galactosidasa)	24
4. Tinciones inmuno-histoquímicas	24
TINCIÓN DE EMBRIONES CON ANTICUERPO	24
TINCIÓN DE DISCOS IMAGINALES CON ANTI-BrdU	25
TINCIONES CON DAPI, DAUNOMICINE Y TOPRO	25
TINCIÓN DE TUNEL	25
TINCIÓN CON NARANJA DE ACRIDINA	25
LOS ANTICUERPOS	25
5. Hibridación "in situ" de cromosomas politénicos	26

6. Escisión del elemento P{SUPor-P}CG12190 ^{KG08683}	26
7. Intercambio de elementos P	27
8. ARN interferente	28
9. Análisis clonal	28
9.1 Clones de falta de función del gen <i>dRYBP</i>	28
9.2 Clones mutantes para el gen <i>dRYBP</i> inducidos en la línea germinal	29
9.3 Clones de sobre-expresión de <i>dRYBP</i>	29
10. Aislamiento de DNA genómico	30
11. PCR inversa	30
12. Construcción de los vectores UAS-RYBP y UAS-PC	30
13. Construcción de proteínas <i>dRYBP</i> mutantes	30
14. PCR cuantitativa	31
15. RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)	31
16. Obtención del anticuerpo anti- <i>dRYBP</i>	32
17. Western-blotting	32
18. Ensayos de Co-inmunoprecipitación	32
19. Ensayos de "Pull-down"	33
20. Expresión ectópica	33
21. Expresión ectópica de <i>dRYBP</i> -GALDB	34
22. Preparación de cutículas adultas y larvarias	34

Resultados

El gen <i>dRYBP</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>	35
La proteína <i>dRYBP</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>	35
Estudio de la expresión de la proteína <i>dRYBP</i>	36
Análisis funcional del gen <i>dRYBP</i>	39
1. OBTENCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN <i>dRYBP</i> MEDIANTE LA ESCISIÓN DE ELEMENTO P[KG08683]	41
2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DE LAS MUTACIONES <i>dRYBP</i> ^{P[KG08683]} , <i>dRYBP</i> ^{Δ16} Y <i>dRYBP</i> ^{Δ55}	43
3. INACTIVACIÓN DE LA FUNCIÓN DE <i>dRYBP</i> MEDIANTE ARN INTERFERENTE	46
Estudio del requerimiento funcional del gen <i>dRYBP</i> durante el desarrollo.	46
1) GENERACIÓN DE CLONES DE FALTA DE FUNCIÓN DE <i>dRYBP</i> EN LA LÍNEA GERMINAL	46
2) REQUERIMIENTO FUNCIONAL DE <i>dRYBP</i> DURANTE EL DESARROLLO	47
2.1) Generación de clones de falta de función de <i>dRYBP</i> durante el desarrollo larvario	47
2.2) Generación de clones de sobre-expresión del UAS-RNAi _{RYBP} durante el desarrollo larvario	48
Estudio de las interacciones genéticas de <i>dRYBP</i> con genes PcG y trxB	48
Estudio de las interacciones moleculares de la proteína <i>dRYBP</i> con proteínas del grupo PcG	49
La proteína <i>dRYBP</i> se comporta como un represor transcripcional cuando se une a ADN	51

La represión transcripcional mediada por dRYBP es dependiente de PcG	53
La sobre-expresión de dRYBP modifica el silenciamiento mediado por el elemento MCP138	53
La sobre-expresión de dRYBP genera fenotipos homeóticos	54
SOBRE-EXPRESIÓN DE dRYBP DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS	54
SOBRE-EXPRESIÓN DE dRYBP EN EL DISCO IMAGINAL DE HALTERIO	55
SOBRE-EXPRESIÓN DE dRYBP EN EL DISCO IMAGINAL DE ALA	56
LA DES-REPRESIÓN DE UBX EN EL DISCO DE ALA OCURRE FUNDAMENTALMENTE EN EL COMPARTIMENTO POSTERIOR	58
SOBRE-EXPRESIÓN DE dRYBP EN EL DISCO IMAGINAL DE PATA	60
Función del gen <i>dRYBP</i> en la apoptosis en <i>Drosophila</i>	60
1. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE dRYBP INDUCE APOPTOSIS EN EL DISCO IMAGINAL DE HALTERIO	61
2. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE dRYBP INDUCE APOPTOSIS EN EL DISCO IMAGINAL DEL ALA	62
FACTORES APOPTÓTICOS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN DE LA MUERTE CELULAR DEBIDO A LA SOBRE-EXPRESIÓN DE dRYBP	64
Función de los dominios de la proteína dRYBP en la activación de la apoptosis y de la expresión de UBX	67
Efecto de la sobre-presión de proteínas PcG y trxG en la regulación de la expresión de la proteína UBX y en la apoptosis	69
Discusión	
El gen <i>dRYBP</i> de <i>Drosophila</i>	72
Expresión del gen dRYBP	72
Función del gen <i>dRYBP</i>. Análisis de los fenotipos de falta de función	73
Actividad transcripcional de la proteína dRYBP	76
Función del gen <i>dRYBP</i>. Análisis de los fenotipos producidos por la sobre-expresión de dRYBP	77
Función de los dominios de la proteína dRYBP	78
Función del gen <i>dRYBP</i> en la apoptosis en <i>Drosophila</i>	79
Función de las proteínas de los grupos PcG y trxG en la apoptosis	82
¿Qué cualifica a una proteína para ser clasificada como una proteína PcG/trxG?	82
Conclusiones	85
Bibliografía	86

RESUMEN DEL TRABAJO EN INGLÉS

FUNCTION OF THE *dRYBP* GENE IN *Drosophila melanogaster*

The *Polycomb* (PcG) and *trithorax* (trxG) groups of genes are involved in the mechanisms of maintenance of gene expression during development. The PcG genes are required for the maintenance of the repressed transcriptional state and the trxG genes are needed for the maintenance of the active transcriptional state. They were initially discovered in *Drosophila* as regulators of homeotic gene expression. However, it is now known that they are conserved from worms to mammals and that they regulate at least 100 genes of the fly genome. In order to understand the mechanism of action of the PcG/trxG proteins, it is necessary to know the factors therein involved.

The aim of this Thesis work has been to study the role of the *dRYBP* (Ring and YY1 Binding Protein) gene in the mechanisms of maintenance of gene expression mediated by the PcG/trxG proteins. The conclusions of this work are the following:

- 1) There is only one *dRYBP* gene in *Drosophila*, phylogenetically conserved, and coding for only one protein with a Zn Finger domain.
- 2) The expression of the dRYBP protein is ubiquitous and nuclear throughout development. The nuclear pattern of expression localizes with the "Polycomb bodies". The pattern of expression during mitosis is dynamic, i.e dRYBP is associated to chromatin during anafase and dissociated of the chromatin at metafase.
- 3) Lack of function of *dRYBP* generates phenotypes with variable penetrance and expressivity including a) lethality throughout development, b) developmental delay, c) defects in mitosis progression, d) production of melanizations in the larval tissue, e) decrease in the imaginal discs size, f) lack of apposition of the ventral and dorsal wing surfaces, and g) sterility
- 4) The GALDB-dRYBP protein behaves as a transcriptional repressor throughout development. This repression is dependent on PcG proteins
- 5) *dRYBP* interacts genetically with the *Sex comb extra* (PcG), and the *trithorax* (trxG) genes. Moreover, dRYBP protein interacts molecularly with SCE and PHO, both of the PcG.
- 6) Over expression of dRYBP generates: a) homeotic phenotypes dependent of PcG and trxG, and b) lack of transcriptional silencing mediated by the MCP138 of the homeotic *Abdominal-B* gene.
- 7) The mechanism involved in the generation of the homeotic phenotypes could be due to the "sequestration" of the PcG and trxG proteins mediated by dRYBP. If so, the dRYBP protein is able to recruit the PcG and the trxG protein complexes. Moreover, this recruitment is mediated by the C-terminal domain of the dRYBP protein.
- 8) Over expression of dRYBP activates apoptosis exclusively in the haltere and the wing imaginal discs. This activation requires the apoptotic factors and the dFADD and DREDD proteins. Also, the activation of the apoptosis seem to require the N terminal domain of the dRYBP protein
- 9) The dRYBP induced apoptosis is modulated by high levels of the TRX protein. Moreover, high levels of the TRX protein, but not of the PC and SCE proteins, activate apoptosis.
- 10) The *dRYBP* gene has properties of both the *Polycomb* and the *trithorax* genes, and therefore, can be included in the group of ETP (Enhancer of Tritheorax and Polycomb) genes.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido	Domain	
abx	anteriobithorax	Dfd	Deformed
Act	Actina	DIAP	Drosophila Inhibitor of apoptosis
abd-A	abdominal-A	DIG	Digoxigenina
Abd-B	Abdominal-B	DOC	Deoxicolato sódico
ADN	Ácido desoxirribonucleico	dp	dumpy
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario	dpp	decapentaplegic
AEL	After egg laying	dsARN	ARN de doble hebra (double-strand)
Ant	Antennapedia	dSFBMT	Scm-related gene containing four mbt domains
Ant-C	complejo antennapedia	DTT	DL-Ditiotreitol
Anti	anticuerpo	e	ebony
arm	armadillo	en	engrailed
ARN	Ácido ribonucleico	EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
ARNi	Ácido ribonucleico interferente	EGTA	Acido Etilenglicoltetraacético
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	egr	eiger
ARNt	Ácido ribonucleico transferente	EtOH	Etanol
ash1	absent, small, or homeotic discs 1	eve	even-skipped
ash2	absent, small, or homeotic discs 2	ETP	Enhancer of trithorax and Polycomb
Asx	Additional sex combs	E(z)	Enhancer of zeste
ATP	Adenosina trifosfato	f	forked
BDGP	Berkeley Drosophila Genome Project	FADD	FAS-associated Death Domain
β-gal	β-galactosidasa	FLP	Flip recombinasa
BRM	Brama	FRT	Flip recombination target (secuencia diana de la FLP)
BrdU	Bromo-desoxiUridina	ftz	fushi tarazu
bs	bluescript	g	Gramo
BSA	Albúmina de suero bovina	GALDB	Gal DNA binding domain
BX	Bithorax	GFP	Green fluorescent protein (proteína fluorescente verde)
BX-C	complejo bithorax	h.	Hora
BXD	Bithoraxoid	hb	hunchback
°C	Grado centígrado	HDACs	Histonas Deacetilasa
caspasas	cisteinil-aspartato proteasas	hid	head involution defective
Ci	Cubitus interruptus	HMT	actividad metil-transferasa de histonas
cn	cinnabar	hsp	Heat shock promotor (promotor de choque térmico)
cols.	Colaboradores	Hox	homeóticos
Cy	Curly	iab	infra-abdominal
CyO	Curly of Oster	IAP	Inhibitor of apoptosis proteins
Da	Dalton	If	Irregular facets
DAB	Diaminobencidina	Ig	Inmunoglobulina
dCBP	Drosophila sarcoplasmic Calcium-Binding Protein	In	Inversión
DED	Death effector domains	JNK	Jun N-terminal kinase
DEDAF	Death Effector domain [DED]-Associated Factor	K	unidad equivalente a 1000 rpm (revoluciones por minuto)
DEDD	DED-containing DNA-binding protein	kb	kilobases
dev	devenir	kis	kismet
Df	Deficiencia		
dFADD	(Drosophila, Factor Associated Death		

kni	knirps	RYBP	Ring and YY1 binding protein
Kr	Krüppel	Sb	Stubble
kto	kohtalo	Sbf1	SET domain binding factor1
L	Litro	sc	scute
lab	labial	SCE	sex comb extra
lolal	lola like (batman)	Scm	Sex comb on midleg
u	micro	Scr	Sex comb reduced
m	mili	sd	scalloped
M	Minute	Ser	serrate
M	molar	SH	solución de hibridación
MCP	Miscadestral pigmentation	Sha	shavenoid
MeOH	Metanol	skd	skuld
min.	minutos	skl	sickle
MOR	Moirá	SNR1	Snf5-related 1
MTH	actividad metil-tranferasa de histonas	STG	string
n	nano	Su(z)12	Supressor of Zeste 12
neo	neomicina	TAC1	Complejo de Acetilación Trx
nub	nubbin	Tb	Tubby
nls	nuclear localization signal (señal de localización nuclear)	TM3	Third multiple three
p	pink	tna	tonalli
pb	pares de bases	TNF	Tumor NecrosisFactor
pb	proboscipedia	Tp	Transposición
PBS	Tampón fosfato salino	TRE	Elemento de Respuesta a trithorax
PBT	Tampón fosfato salino + tritón	Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
pbx	postbithorax	Trl	Trithorax like
Pc	Polycomb	trx	trithorax
PcG	Polycomb group	trx-G	trithorax group
Pcl	Polycomb like	Tunel	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labelling
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	Uab	Ultra-abdominal
PFA	Paraformaldehído	UAS	Upstream activation sequence
ph	polyhomeotic	Ubi	Ubiquitina
PHO	Pleihomeotic	Ubx	Ultrabithorax
PHOL	Pleihomeotic-like	vg	vestigial
PMFS	Phenylmethilsulfonil fluoride	vol.	Volumen
ppa	partner of paired	w	white
pr	purple	wg	wingless
PRC1	Polycomb Repressive Complex 1	y	yellow
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2	YAF-2	YY1 associated factor-2
PRE	Elemento de Respuesta a Polycomb	YAAF-1	YY1 and E4TF1/hGABP-associated factor-1
PS	parasegmento	YY1	Ying Yang 1
PSC	Posterior sex comb	z	zeste
psq	pipsqueak	ZF	Zinc finger
RACE	Rapid Amplification of cDNAs Ends (Amplificación rápida de extremos de ADNc)		
ry	rosy		
rpr	reaper		

INTRODUCCIÓN

***Drosophila melanogaster*, sistema modelo para el estudio de la Biología del Desarrollo**

Hace más de un siglo, Thomas Hunt Morgan introdujo *Drosophila melanogaster* como sistema modelo para estudios Genéticos y de la Biología del desarrollo, disciplina que estudia los mecanismos implicados en la formación de los organismos. El conocimiento de la Genética y de la Biología de *Drosophila* ha avanzado considerablemente en estos años, lo que permite disponer de técnicas y herramientas genéticas no disponibles en otros organismos modelos. Además, posee unas características biológicas idóneas para su uso como modelo experimental, como son, su pequeño tamaño, su ciclo biológico corto, su reducido número de cromosomas y su elevada fertilidad. Asimismo, posee unos cromosomas gigantes (politénicos) en los tejidos larvarios que son de gran utilidad para estudios citogenéticos.

Debido a la homología de los genes de *Drosophila* con los otros organismos y muy importante, debido a la conservación de los mecanismos moleculares que controlan la expresión génica, *Drosophila melanogaster* se está utilizando no sólo para el estudio de la Biología del Desarrollo sino también para el estudio de los procesos fisiológicos en vertebrados y de la etiología de las enfermedades humanas.

Ciclo vital y morfología del cuerpo de *Drosophila*

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo, es decir, con una metamorfosis completa, que tiene un ciclo de vida de aproximadamente 10 días de duración a una temperatura de 25°C. Una vez que el huevo ha sido fecundado y depositado tarda 24 horas en eclosionar. Tras la eclosión, aparece una larva que, en un periodo de cuatro días, pasa por tres estadios larvarios diferentes. Durante esta fase se forman los primordios, que darán lugar a las estructuras adultas: los discos imaginales y los histoblastos abdominales. Los últimos cinco días del ciclo corresponden a la fase pupal

en la que tiene lugar la metamorfosis durante la cual, los primordios imaginales se transforman en estructuras adultas, emergiendo al final de este periodo el individuo adulto o imago (**Figura 1**). (Ashburner, 1989).

El cuerpo de los insectos está dividido en segmentos o metámeros que, en el caso particular de *Drosophila melanogaster*, se compone de 3 segmentos cefálicos, 3 segmentos torácicos y diez segmentos abdominales. Además, también presenta dos estructuras no segmentadas: el acron, en la parte más anterior y el telson, en el extremo posterior (**Figura 2**). La cabeza, el tórax y sus apéndices, la analia y la genitalia se generan a partir de los discos imaginales que, fundamentalmente, proliferan en los estadios larvarios. Sin embargo, los

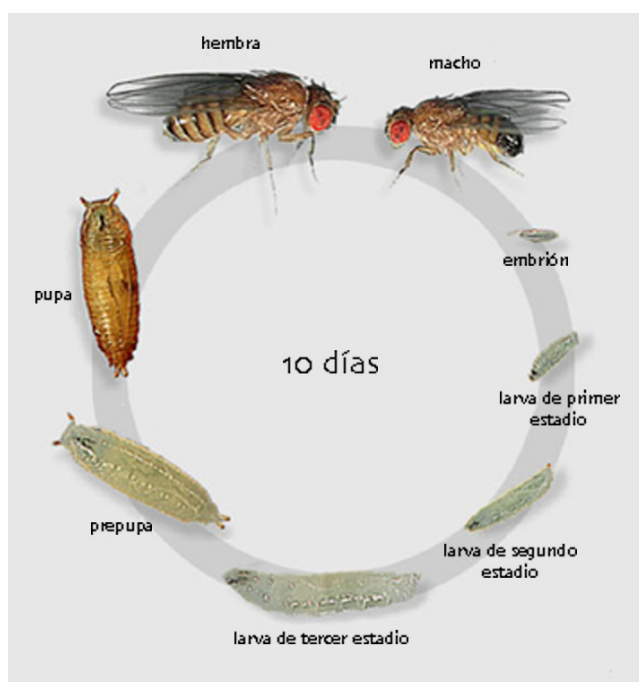


Figura 1.
Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*.
Tomado de FlyMove.

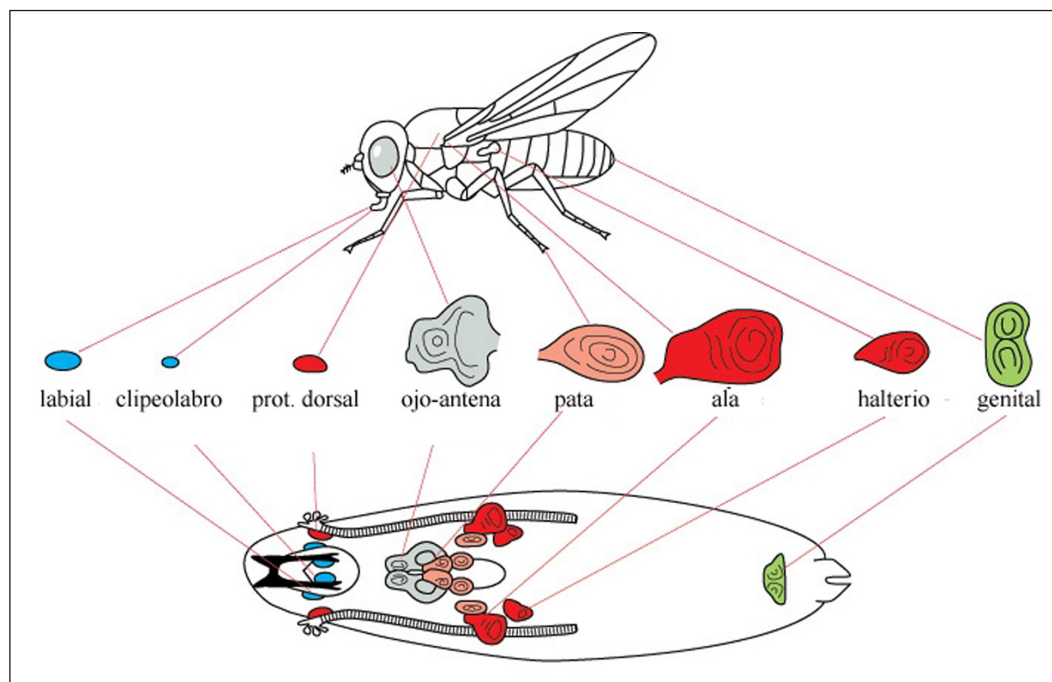


Figura 2. Representación esquemática de los distintos discos imaginales de *Drosophila*, su posición en la larva y la estructura adulta a la que darán lugar. Modificado de (Alberts y cols., 2002).

segmentos abdominales se generan a partir de los histoblastos abdominales, cuya proliferación tiene lugar durante el periodo pupal. Los segmentos se subdividen muy temprano durante la embriogénesis en dos poblaciones de células distintas; los compartimentos anteriores (A) y los posteriores (P) (García-Bellido y cols., 1973, Morata y Lawrence, 1975). Los compartimentos son unidades de linaje celular ya que ambas poblaciones celulares no se mezclan durante el crecimiento, debido a sus propiedades de afinidad que son específicas de las células de cada compartimento. La unidad metamérica funcional durante el desarrollo embrionario es el parasegmento (PS), que se compone del compartimento posterior de un segmento y el compartimento anterior del segmento siguiente (Martínez-Arias y Lawrence, 1985). El cuerpo del embrión de *Drosophila* se divide en 14 parasegmentos (PS) (Figura 3).

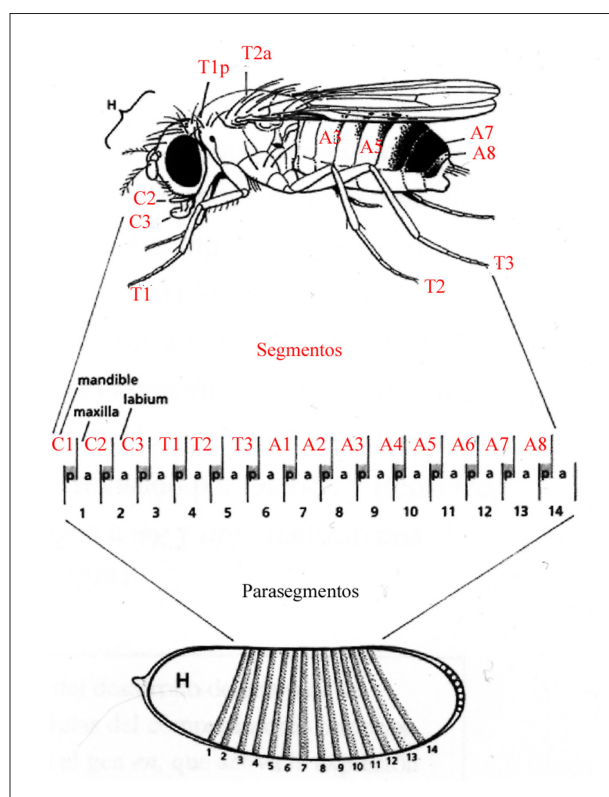


Figura 3. Correspondencia entre los parasegmentos y los segmentos en el embrión y en el adulto a lo largo del eje antero-posterior. Las 14 bandas de expresión del gen *engrailed* en el embrión que se muestran definen los bordes de los parasegmentos. Modificado de (Lawrence, 1992).

Generación del patrón morfológico

GENES DE SEGMENTACIÓN: FORMACIÓN DE LOS SEGMENTOS

El proceso de segmentación comienza muy temprano en el desarrollo (**Figura 4**). En este proceso intervienen una serie de genes, que codifican en su mayoría factores de transcripción, que actúan secuencialmente durante el desarrollo. El eje antero-posterior empieza a establecerse por los genes maternos, que regulan la expresión de los genes “gap”, por ejemplo, *hunchback* (*hb*) y *Krüppel* (*Kr*). Los genes “gap” controlan la expresión de los genes “pair rule”, entre ellos *even-skipped* (*eve*) y *fushi tarazu* (*ftz*), que se expresan respectivamente en 7 bandas complementarias. La actividad combinatoria de los genes “pair rule” determina los valores de información posicional a lo largo del eje antero-posterior en el que se basa el patrón definitivo de 14 parasegmentos. Una vez establecido el número

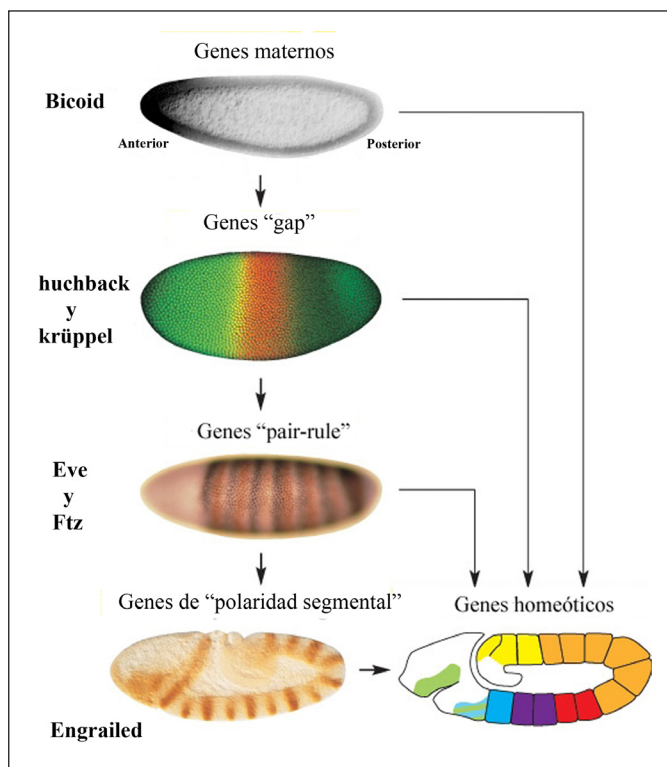


Figura 4. Cascada de regulación génica implicada en la generación del cuerpo segmentado en el embrión. Las proteínas maternas activan la expresión de genes zigóticos “gap” y “pair rule”, cuyas proteínas activan, a su vez, a los genes de “polaridad segmental” y a los genes homeóticos. Modificado de (Alberts y cols., 2002)

de parasegmentos los genes de “polaridad segmental”, como por ejemplo *engrailed*, especifican los compartimentos dentro de cada parasegmento. Tanto los genes “pair rule” como los genes de “polaridad segmental” establecen los límites de expresión de los genes homeóticos, que otorgan identidad a cada uno de los segmentos (Lawrence, 1992).

GENES HOMEÓTICOS: GENERACIÓN DE IDENTIDAD SEGMENTAL

Los genes homeóticos (Hox) controlan la diversidad morfológica de los segmentos del cuerpo de la mosca (Lewis, 1978), determinando las estructuras que han de formarse en cada segmento, y por tanto definiendo su propia identidad. Por ejemplo, el segundo segmento torácico desarrolla un ala y el tercer segmento torácico desarrolla un halterio (**Figura 5**). Los genes Hox codifican factores de transcripción muy conservados en la evolución que coordinan la actividad de otros genes, organizando el desarrollo del mesodermo, endodermo, tejido nervioso y epidérmico de animales tan distintos como vertebrados, moscas o gusanos (Akam y cols., 1994, Krumlauf, 1994).

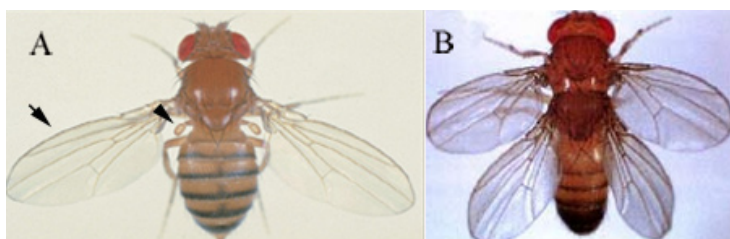


Figura 5. Ejemplo de transformación homeótica. (A) Mosca silvestre, donde se indican las alas (flecha) y los halterios (cabeza de flecha). (B) Mosca conteniendo una mutación en el gen homeótico *Ultrabithorax*, mostrando que el halterio cambia de identidad transformándose hacia ala. Modificado de (Alberts y cols., 2002).

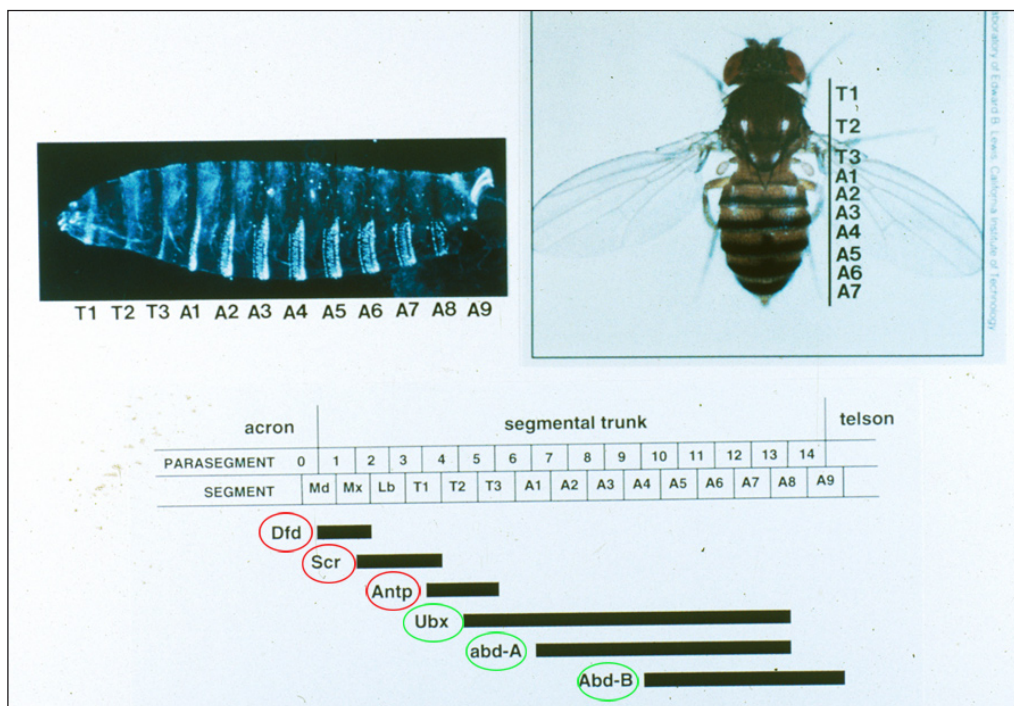


Figura 6. En el panel superior se muestran los patrones segmentales de la larva y del adulto de *Drosophila*. En el panel inferior se muestra un esquema de la correspondencia entre los parasegmentos y los segmentos, además de los dominios de expresión, a lo largo del eje antero-posterior del embrión, de algunos genes del Complejo *Antenapedia* y de los genes del complejo *bithorax*.

Los genes Hox comparten en su secuencia una característica estructural y funcional denominada caja homeótica, de 180 pb, que también está presente en otros genes involucrados en el control genético del desarrollo en vertebrados, plantas y hongos (Manak y Scott, 1994). La caja homeótica codifica el homeodominio, de 60 aminoácidos que forman una estructura hélice-vuelta-hélice de unión a secuencias específicas de ADN, necesario para la función de la proteína (McGinnis y cols., 1984, Scott y cols., 1989, Scott y Weiner, 1984). Otra característica de los genes Hox es la co-linealidad existente entre su posición próximo-distal en el cromosoma y su expresión a lo largo del eje antero-posterior del cuerpo de la mosca (Lewis, 1978) (**Figura 6**).

En *Drosophila*, los genes Hox se agrupan en dos complejos génicos: el complejo *Antenapedia* (Ant-C) y el complejo *bithorax* (BX-C). La acción conjunta de ambos complejos controlan el desarrollo del cuerpo (Duncan, 1987, Lewis, 1978), con excepción de la analia, controlado por el gen *caudal* (Moreno y Morata, 1999). El Ant-C está compuesto, en un orden próximo-distal respecto a su localización en el cromosoma de los siguientes genes: *labial* (*lab*), *Deformed* (*Dfd*), *proboscipedia* (*pb*), *Sex combs reduced* (*Scr*) y *Antennapedia* (*Ant*) (**Figura 6**). Estos genes especifican la identidad del PS1 hasta el PS4 (Kaufman y cols., 1990), los cuales comprenden la cabeza y los dos primeros segmentos torácicos.

El complejo bithorax

El BX-C está formado por tres genes, que en orden próximo-distal son: *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) y *Abdominal-B* (*Abd-B*) (Sanchez-Herrero y cols., 1985, Tiong y cols., 1985). Estos genes otorgan la identidad desde PS5 al PS14, que corresponden con el tercer segmento torácico y los ocho segmentos abdominales, y se expresan en epidermis, sistema

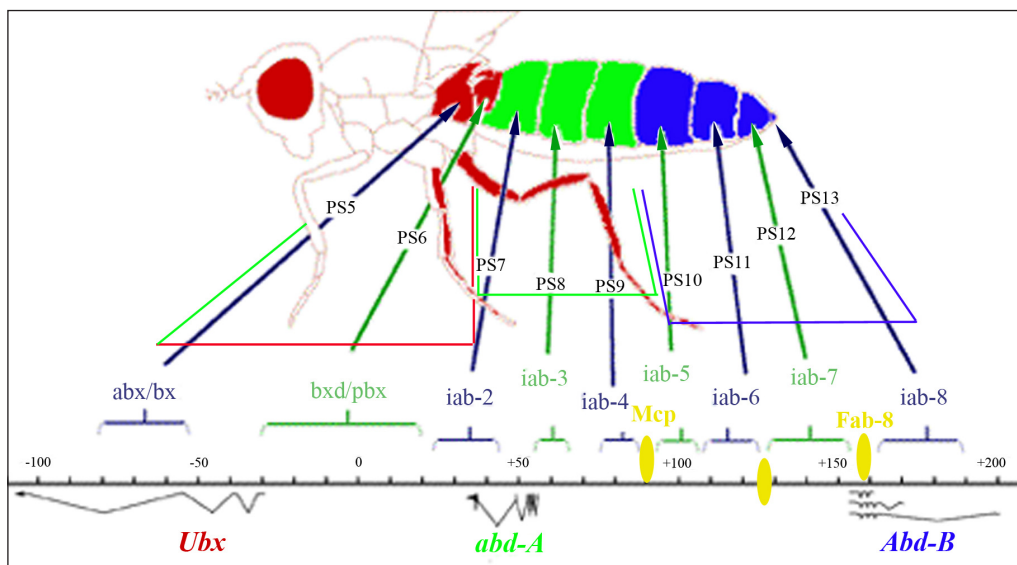


Figura 7. Composición génica y dominio de acción de los genes del complejo bithorax. El Complejo bithorax está compuesto por los genes *Ubx* (rojo), *abd-A* (verde) y *Abd-B* (azul). El esquema muestra los dominios de acción de las tres unidades de transcripción y de sus secuencias *cis*-reguladoras en la mosca adulta

nervioso central (SNC) y mesodermo visceral y somático (Celniker y cols., 1989, DeLorenzi y cols., 1988, Karch y cols., 1990, Kornfeld y cols., 1989, Zavortink y Sakonju, 1989)

El análisis molecular del complejo reveló que está comprendido en una región de 300Kb de ADN, la cual contiene tres unidades de transcripción que dan cuenta sólo del 2% de la secuencia total. En el 98% restante existen diversas regiones reguladoras que confieren la especificidad espacial y temporal de la expresión de los productos proteicos (Martin y cols., 1995, Sanchez-Herrero y Akam, 1989, Zhou y cols., 1999).

DOMINIOS CIS-REGULADORES DEL BX-C.

El estudio genético y molecular de los genes del BX-C identificó en su secuencia nueve regiones *cis*-reguladoras específicas de parasegmento (**Figura 7**) (Duncan, 1987). La colinealidad también existe en estas sub-regiones reguladoras, ya que el orden en el que se disponen a lo largo del cromosoma es el mismo que presentan los parasegmentos a los que regulan a lo largo del eje antero-posterior (Karch y cols., 1985). Los dominios *cis*-reguladores *abx/bx* y *bxd/pbx* dirigen la expresión del gen *Ubx* en los PS5 y PS6, respectivamente (Bender y cols., 1983, Morata y cols., 1986, Simon y cols., 1990). La expresión de *abd-A* y *Abd-B* en cada uno de los parasegmentos está controlada por las regiones reguladoras denominadas *infra-abdominal* (*iab*). La expresión del gen *abd-A* en los PS7, PS8, PS9 está controlada por las regiones *iab-2*, *iab-3* e *iab-4*, respectivamente (Karch, y cols., 1990), mientras que la expresión del gen *Abd-B* desde el PS10 hasta el PS14 depende de *iab-5*, *iab-6*, *iab-7* e *iab-8* (Celniker, y cols., 1989, Sanchez-Herrero, 1991) (**Figura 7**).

El análisis genético propuso que los dominios reguladores tienen la capacidad de determinar la información posicional a lo largo del eje A/P, ya que dirigen la expresión específica de parasegmento de los genes homeóticos a los que regulan. Esta proposición se pudo demostrar en estudios con moscas transgénicas donde la expresión del gen marcador *lacZ* era dirigida por un dominio *cis*-regulador concreto. Como se había propuesto, estas regiones reguladoras dirigen, desde muy temprano en el desarrollo, la expresión del gen marcador con un borde de expresión anterior, el cual es específico de parasegmento (Busturia y Bienz, 1993, Qian y cols., 1991, Sánchez-Herrero, 1991, Simon, y cols., 1990). Por ejemplo, fragmentos derivados de *abx/bx*, *iab-2* e *iab-5* dirigen la expresión del gen *lacZ* en PS5, PS7 y PS10, respec-

tivamente. Estas observaciones sugieren que cada región reguladora dirige la expresión de una manera autónoma (Bender, y cols., 1983, Sanchez-Herrero, y cols., 1985).

Mutaciones en estas regiones no son letales y son clasificadas como subgrupos dentro de los mutantes *Ubx*, *abd-A* o *Abd-B*, dependiendo del gen al que afecten (Busturia y cols., 1989, Casanova y cols., 1986, Karch, y cols., 1985, Lewis, 1978). Las mutaciones de pérdida de función de cada una de estas regiones *cis*-reguladoras producen una transformación del parasegmento correspondiente en el parasegmento inmediatamente anterior y el correspondiente cambio de patrón de expresión.

Elementos de Respuesta a Polycomb (PREs) y Elementos de Respuesta a trithorax (TREs)

Además de los elementos activadores, que inician la expresión de los genes homeóticos en los correspondientes parasegmentos, se han caracterizado otro tipo de elementos reguladores de la expresión. Se aislaron mutaciones, como *Mcp¹*, *Fab⁷* y *Fab⁸*, que producían fenotipos de ganancia de función debido a la sobre-expresión del gen *Abd-B* en parasegmentos anteriores (Barges y cols., 2000, Galloni y cols., 1993, Karch, y cols., 1985, Lewis, 1978) Por ejemplo,

la mutación *Mcp¹* transforma el segmento A4 en A5 y produce la expresión ectópica de la proteína *Abd-B* en A4 y su correspondiente transformación homeótica (Celniker y cols., 1990) (**Figura 8**). Se postuló que las regiones reguladoras donde mapeaban estas mutaciones correspondían a elementos aisladores o silenciadores del gen *Abd-B*.

El análisis molecular de los promotores de los genes homeóticos, ha detectado estas regiones aisladoras con función represora de la expresión del gen *Abd-B*, y ha llevado al aislamiento de secuencias de ADN que, cuando se estudia su actividad con animales transgénicos, son capaces de mantener la expresión de los genes marcadores y, además, responder a proteínas del grupo Polycomb PcG y/o del grupo trithorax *trxG* (ver más adelante). De ahí que a estos elementos se les haya denominado Elementos de Respuesta a Polycomb (PREs) y Elementos de Respuesta a trithorax (TREs). Los PREs son secuencias de ADN de unas 100-300 pb que pueden estar cerca o lejos de los promotores, a las que se unen las proteínas Polycomb y señalizan los genes específicos sobre los que ellas deben actuar (Chiang y cols., 1995, Horard y cols., 2000, Mishra y cols., 2001). Loci complejos como los homeóticos, están regulados por distintos PREs y TREs. Uno de los PREs identificados en el gen *Abd-B* es el elemento MCP, localizado entre la región *iab4* e *iab5* (**Figura 7**) que mantiene la secuencia activadora específica del PS10 del dominio *cis*-regulador *iab5* reprimida en el PS9 (Busturia y Bienz, 1993, Busturia y cols., 1997) y que se utiliza en esta Tesis como herramienta para el estudio del mantenimiento transcripcional. Los TREs son también secuencias específicas que señalizan a las proteína Trithorax los genes sobre los

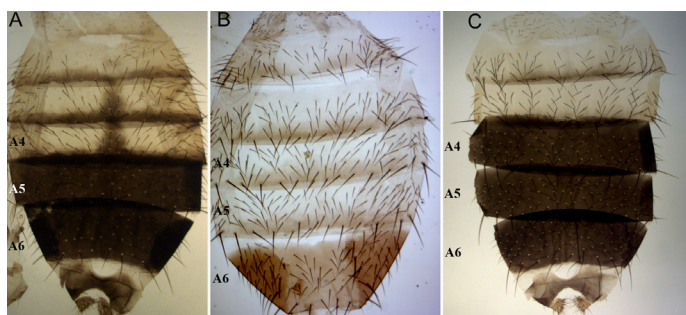


Figura 8. Fenotipos homeóticos de mutaciones en los elementos *cis*-reguladores del gen *Abd-B*. (A) Abdomen de macho silvestre presentando la pigmentación normal en la cutícula de los segmentos abdominales a5 y a6. (B) Abdomen de un macho conteniendo una mutación en la región *cis*-reguladora *iab-5* que produce transformación de a5 en a4 como se observa por la falta de pigmentación. (C) Abdomen de un macho *Mcp¹*, que produce la transformación del segmento a4 en a5 indicado por la pigmentación.

la expresión del gen *Abd-B*, y ha llevado al aislamiento de secuencias de ADN que, cuando se estudia su actividad con animales transgénicos, son capaces de mantener la expresión de los genes marcadores y, además, responder a proteínas del grupo Polycomb PcG y/o del grupo trithorax *trxG* (ver más adelante). De ahí que a estos elementos se les haya denominado Elementos de Respuesta a Polycomb (PREs) y Elementos de Respuesta a trithorax (TREs). Los PREs son secuencias de ADN de unas 100-300 pb que pueden estar cerca o lejos de los promotores, a las que se unen las proteínas Polycomb y señalizan los genes específicos sobre los que ellas deben actuar (Chiang y cols., 1995, Horard y cols., 2000, Mishra y cols., 2001). Loci complejos como los homeóticos, están regulados por distintos PREs y TREs. Uno de los PREs identificados en el gen *Abd-B* es el elemento MCP, localizado entre la región *iab4* e *iab5* (**Figura 7**) que mantiene la secuencia activadora específica del PS10 del dominio *cis*-regulador *iab5* reprimida en el PS9 (Busturia y Bienz, 1993, Busturia y cols., 1997) y que se utiliza en esta Tesis como herramienta para el estudio del mantenimiento transcripcional. Los TREs son también secuencias específicas que señalizan a las proteína Trithorax los genes sobre los

que actuar (Tillib y cols., 1999). El estudio de estas secuencias ha revelado que las acciones llevadas a cabo por PcG y trxB, que en un principio son opuestas, se realizan de una forma coordinada. En muchos casos las secuencias de los PREs solapan con las de los TREs (Tillib, y cols., 1999), lo que implica que en numerosas ocasiones las proteínas PcG y trxB compartan sitios de interacción (Orlando y cols., 1998, Strutt y cols., 1997, Tillib, y cols., 1999). Este solapamiento, podría facilitar las interacciones entre las proteínas PcG y trxB, o bien reflejar la utilización de factores en común para ejercer sus funciones.

Establecimiento de los patrones de expresión de los genes homeóticos

Desde muy temprano en la embriogénesis, la expresión de los genes homeóticos se restringe a dominios específicos, mostrando un límite de expresión muy definido en una posición determinada a lo largo del eje antero-posterior del embrión (**Figura 6**). Se establece, por tanto, un dominio donde los genes homeóticos están activados y un dominio donde están reprimidos. Ambos dominios se tienen que mantener en la misma posición a lo largo del desarrollo, ya que variaciones en la expresión de los genes homeóticos en cualquier momento del desarrollo conlleva transformaciones fenotípicas severas y, en muchos casos, letalidad.

Los dominios de expresión de los genes homeóticos se establecen por los genes de segmentación. Se analizó la expresión de los genes homeóticos en fondos mutantes para los "genes gap" y se descubrió que éstos actuaban como represores, ya que, por ejemplo, la expresión del gen *Ubx*, cuyo límite de expresión está en el PS5, en un fondo mutante para el gen "gap" *hunchback* se expandía hacia segmentos anteriores (Harding y Levine, 1988). De la misma forma se descubrió que los genes "pair rule" actuaban como activadores de la expresión de los genes homeóticos, ya que, en un fondo mutante para el gen *eve*, la expresión de *UBX* desaparecía en los correspondientes parasegmentos (Jack y McGinnis, 1990).

El análisis de los promotores de los genes homeóticos desveló los mecanismos moleculares involucrados en el establecimiento de sus dominios de expresión. Estos estudios llevaron a la proposición de que los patrones de expresión de los genes homeóticos resultan de la "represión transcripcional activa" que tiene lugar fuera de sus dominios de expresión. Parece que esto ocurre por un mecanismo de competición entre los activadores y los represores por la unión a las zonas reguladoras de los genes Hox, estableciéndose así los dominios reprimidos/activados (Stanojevic y cols., 1991). La **Figura 9** muestra un ejemplo de cómo este mecanismo establece los límites de expresión de los genes *Ubx* y *Abd-B*. La represión comienza por las proteínas de segmentación *hunchback* (*HB*) y *Krüppel* (*KR*), cuya expresión es complementaria a la expresión de los genes *Ubx* y *Abd-B*, respectivamente. Para el caso

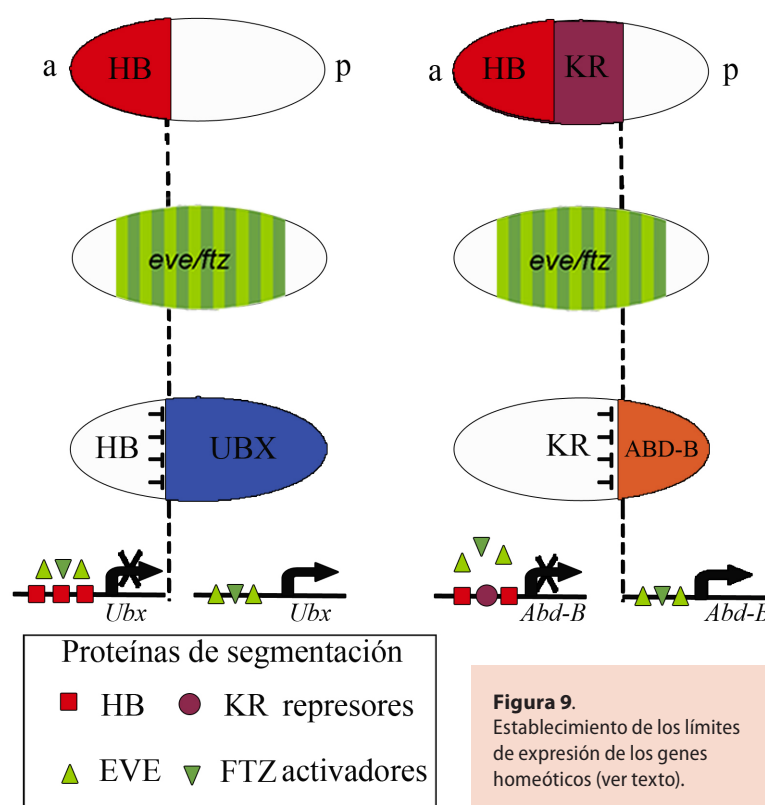


Figura 9. Establecimiento de los límites de expresión de los genes homeóticos (ver texto).

del gen *Ubx*, anterior al PS5, la competición por la unión al ADN ocurre entre HB, como represor y FTZ y EVE, como activadores. El resultado de esta competición es favorable a HB y, por consiguiente, la expresión del gen *Ubx* se reprime. Posterior al PS5, HB no se expresa o lo hace en niveles que no son suficientes para desplazar a los activadores y, por lo tanto el gen *Ubx* se transcribe. De la misma forma ocurre con el borde de expresión de *Abd-B* en el PS10, donde se genera una competición por la unión a las regiones reguladoras entre la proteína KR, como represor y FZT y EVE, como activadores.

Mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos durante el desarrollo

Una vez se han establecido los dominios de expresión/represión de los genes homeóticos mediante la acción de los genes de segmentación, estos dominios deben ser mantenidos durante todo el desarrollo, a lo largo del cual tienen lugar múltiples divisiones celulares. Las proteínas de segmentación sólo se expresan durante las cuatro primeras horas del desarrollo (Jackle y cols., 1992), mientras que los genes homeóticos se expresan y se requieren funcionalmente a lo largo de todo el desarrollo. Es por ello por lo que deben existir otras proteínas y otros mecanismos implicados en el mantenimiento de sus dominios de expresión. Aquí entran en funcionamiento los genes del grupo *Polycomb* (*PcG*) (**Tabla 1**) (Jürgens, 1985, Lewis, 1978), que son los responsables de mantener el estado transcripcional reprimido, y los genes del grupo *trithorax* (*trxG*) (**Tabla 2**) necesarios para mantener el estado transcripcional activo (Kennison y Tamkun, 1988).

Tabla 1:
Genes PcG, dominios proteicos y complejos a los que pertenecen.

Gen	Drosophila	Vertebrados	Complejo	Dominios/Función
<i>Polycomb</i>	<i>Pc</i>	HPC1, HPC2, HPC3, M33	PRC1	Cromodominio/Sumolización
<i>Polyhomeotic</i>	<i>ph</i>	HPH1, HPH2	PRC1	Dominio SAM
<i>Posterior sex combs</i>	<i>Psc</i>	BMI1, MEL-18	PRC1	Dominio Ring finger
<i>dRING/Sex combs extra</i>	<i>Sce</i>	RING1	PRC1	Ring finger/ E3 ubiquitin ligasa
<i>Enhancer of zeste</i>	<i>E(z)</i>	EZH1 (ENX2), EZH2 (ENX1)	PRC2	SET/Histona metiltransferasa: H3K9, H3K27
<i>Extra sex combs</i>	<i>esc</i>	EED	PRC2	Dominio WD40
<i>Suppressor of zeste 12</i>	<i>Su(z) 12</i>	SUZ12	PRC2	
<i>Pleiohomeotic</i>	<i>pho</i>	YY1	PHORC	Secuencia de unión a ADN de pho: GCCATHWY Secuencia de unión a DNA de YY1 :VDCCATNWY o GACATNTT, VKDCATNWB
<i>Pleiohomeotic-like</i>	<i>phol</i>	YY1	PHORC INO80	Secuencia de unión a ADN de Pho-like: GCCATHWY
<i>Polycomblike</i>	<i>Pcl</i>	PCL1, PCL2	PRC1	PHD finger
<i>Sex comb on midleg</i>	<i>Scm</i>	SCMH1, SCML2	PRC1	Dominio SAM
<i>Additional sex combs</i>	<i>Asx</i>	ASXL1, ASXH2		
<i>Enhancer of Polycomb</i>	<i>E(Pc)</i>	EPC1		
<i>Suppressor of zeste (2)</i>	<i>Su(z)2</i>	BMI1, MEL-18		RING finger
<i>Corto</i>	<i>corto</i>			Cromodominio
<i>Lola like (batman)</i>	<i>lolal</i>			Dominio BTB/POZ
<i>Pipsqueak</i>	<i>psq</i>			Secuencia de unión a ADN: GA(n)

LOS GENES DEL GRUPO *Polycomb* (PcG)

Los genes *Polycomb* se descubrieron en *Drosophila* por sus efectos sobre la regulación espacial de la expresión de los genes homeóticos (Lewis, 1978). Mediante experimentos de mutagénesis a saturación se ha predicho la existencia de unos 40 genes del PcG, de los que por el momento sólo se han aislado y caracterizado molecularmente 20 (**Tabla 1**) (Jürgens, 1985, Simon, 2003). El estudio de la expresión de los genes homeóticos en mutantes para PcG mostró que éstas no son requeridas para el establecimiento de la expresión de los genes homeóticos, sino sólo para el mantenimiento (Lewis, 1978, Simon y cols., 1992, Struhl, 1983). Además, se ha demostrado que los genes PcG son, en su mayoría, requeridos durante todo el desarrollo para el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos (Busturia y Morata, 1988, Duncan, 1982).

Actualmente, se conoce que los genes PcG regulan el mantenimiento de la expresión de una gran variedad de genes implicados en múltiples procesos biológicos (Brock y Fisher, 2005). El fenotipo prototipo de mutaciones en genes del grupo PcG consiste en transformaciones de estructuras anteriores en posteriores. En embriones mutantes homocigóticos para PcG, los tres segmentos torácicos y los siete primeros segmentos abdominales están transformados hacia el segmento abdominal más posterior (A8) como resultado de la des-represión de los genes Hox en segmentos anteriores, lo que conlleva un cambio de identidad segmental. Los individuos adultos muestran transformaciones de antena a pata, peines sexuales extra en pata meso-torácica y meta-torácica, transformaciones de ala a halterio y transformaciones de estructuras corporales anteriores en posteriores en los segmentos abdominales. No todas las mutaciones en genes PcG producen estos fenotipos homeóticos tan evidentes, quizás debido en algunos casos a la permanencia de la proteína materna o a la existencia de otras proteínas que parcialmente puedan suplir su función.

Las proteínas PcG son proteínas nucleares asociadas a cromatina que se expresan en la mayoría de las células del embrión y en los discos imaginales. La familia PcG engloba un conjunto de proteínas heterogéneas. Poseen dominios de secuencias conservadas encontradas en otras proteínas de unión a cromatina como, por ejemplo, cromodominios y bromodominios, además de otros dominios que permiten la interacción proteína-proteína, como Zinc-finger y Ring-finger (Simon, 2003). A pesar de que algunas proteínas tienen dominios de unión a ADN, sólo una de ellas PHO y su homólogo PHO-LIKE son capaces de unirse a secuencias específicas de ADN, (Brock y Fisher, 2005, Brown y cols., 1998, Fritsch y cols., 1999) (**Tabla 1**).

COMPLEJOS PROTEICOS DEL PcG

La mayoría de las proteínas del PcG son miembros de complejos multiméricos que actúan regulando la expresión de los genes diana. Las evidencias experimentales que apoyan esta afirmación están basadas en las siguientes observaciones: 1) miembros de la familia PcG actúan de una forma sinérgica en la expresión de los genes homeóticos (Campbell y cols., 1995, Cheng y cols., 1994, Jürgens, 1985). 2) Colocalizan en sitios comunes en los cromosomas politénicos, incluidos los genes Hox (Carrington y Jones, 1996, Franke y cols., 1992, Lonie y cols., 1994, Martin y Adler, 1993, Rastelli y cols., 1993, Zink y Paro, 1989, Gildea y cols., 2000, Petruk y cols., 2001). 3) Experimentos de inmunoprecipitación han demostrado que complejos multiproteicos precipitan con anticuerpos para proteínas PcG y trxG en extractos nucleares de embriones. 4) Experimentos de doble híbrido en levaduras revelan la existencia de interacciones físicas entre distintas proteínas del PcG (Alkema y cols., 1997, Franke, y cols., 1992, Jones y cols., 1998, Kyba y Brock, 1998, Peterson y cols., 1997, Shao y cols., 1999, Strutt y Paro, 1997, Tie y cols., 1998).

Apoyando todas estas evidencias experimentales, se ha descrito la existencia de al menos dos complejos aislados bioquímicamente y purificados de embriones de 0-12 horas

de edad. Los complejos son PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) (Francis y cols., 2001) y PRC2 (Ng y cols., 2000). PRC1 tiene un peso molecular de 2MDa. Los componentes del núcleo de PRC1 incluyen a 4 proteínas que han sido genéticamente definidas como proteínas PcG: Polycomb (PC), Polyhomeotic (PH), Posterior sex comb (PSC) y Sex comb extra (SCE/dRING). Se ha demostrado que, aunque este núcleo de proteínas puede bloquear la remodelación de la cromatina “in vitro”, no tiene preferencias por secuencias de ADN presentes en los PRE. La inclusión de ZESTE en el complejo hace que aumente la actividad de represión de la remodelación de la cromatina así como la unión por sitios específicos reconocidos por Zeste que se encuentran en los PRE (Mulholland y cols., 2003). El complejo PRC2 tiene un peso molecular de 600 KDa. Está compuesto por 3 proteínas que han sido genéticamente identificadas como PcG: ESC (Extra Sex Comb), E(Z) (Enhancer of Zeste) y Su(Z)12 (Supressor of Zeste 12) (Jones, y cols., 1998, Tie, y cols., 1998). La función de PRC2 es anclar al complejo PRC1 a los diferentes loci genéticos. El complejo PRC2 tiene actividad metil-transferasa de histonas (HMT) y puede metilar la lisina 9 y/o 27 de la histona H3 (**Figura 12**) de los nucleosomas incrementando la afinidad de proteínas, como PC, por aquellos sitios con histonas metiladas (Czermin y cols., 2002). Parece que, además de tener distintos componentes y, por tanto, diferir en sus actividades bioquímicas, los dos complejos también se diferencian en el momento del desarrollo en el que actúan. Se ha sugerido que PRC1 y PRC2 son parte de un gran complejo represor durante las fases tempranas del desarrollo embrionario, pero que, sin embargo, los dos complejos se separan en fases más tardías (Poux y cols., 2001).

En los PREs se encuentran sitios para la unión de GAF y PHO (Brown, y cols., 1998). Ambas proteínas se asocian con proteínas del grupo PcG, sin embargo, ni GAF ni PHO se encuentran en los complejos que han sido purificados bioquímicamente, sugiriendo o que esta interacción es transitoria (Poux y cols., 2001) o la existencia de otros complejos conteniendo dichas proteínas. Se ha encontrado que PHO forma parte de dos complejos diferentes: Pho-dINO80 que contiene el complejo remodelador de nucleosoma INO80 y el complejo PhoRC que contiene la proteína dSFMBT (Scm-related gene containing four mbt domains), una proteína PcG recientemente descubierta (Klymenko y cols., 2006). El complejo PhoRC combina la capacidad de unión a ADN de PHO con la actividad de unión a histonas modificadas de dSFMBT, que puede unirse a residuos de lisina mono- o di-metilados. Se ha propuesto que PhoRC unido a un PRE, selectivamente interacciona con las histonas metiladas de los PRE que lo flanquean para mantener el estado de cromatina reprimido.

Se han identificado proteínas asociadas a los complejos PcG, cuya pertenencia al “núcleo proteico” de uno u otro complejo es polémica ya que las conclusiones dependen de muchos factores como las condiciones de aislamiento bioquímico y las interacciones genéticas estudiadas (Lund y van Lohuizen, 2004). Este es el caso de las HDACs (Histonas Deacetylase), RPD3 y p55 (Otte y Kwaks, 2003) que desempeñan un papel importante en la represión mediada por la cromatina, y que se han encontrado asociadas al complejo PRC1 de (Chang y cols., 2001, Francis, y cols., 2001, Poux, y cols., 2001) y al complejo PRC2 de *Drosophila* (Tie y cols., 2001). Hasta el momento, lo más razonable es pensar que existe una relación funcional entre la represión mediada por PcG y la actividad del HDACs, aunque no esté claro ni a qué complejos pertenecen ni si las interacciones con los complejos son estables o transitorias.

Si bien los “núcleos proteicos” de los complejos son similares en *Drosophila* y humanos, el complejo PRC1 de *Drosophila* contiene proteínas adicionales como ZESTE, SCM y varios factores de transcripción (Saurin y cols., 2001), no encontrados en PRC1 de humanos. La ausencia de proteínas PcG adicionales en el PRC1 de humanos es probablemente debido a que estos complejos fueron aislados de células Hela que son pobres en componentes del grupo PcG (Otte y Kwaks, 2003). Los tres componentes del “núcleo proteico” de PRC2 se mantienen tanto en los complejos purificados de células humanas como de embriones de *Drosophila*.

LOS GENES DEL GRUPO *trithorax* (*trx-G*)

Los genes del grupo *trithorax* se requieren para el mantenimiento del estado transcripcional activo de los genes homeóticos (Breen y Harte, 1991, Breen y Harte, 1993, Brizuela y cols., 1994). La mayoría de los genes *trxG* fueron descubiertos porque mutaciones en los mismos suprimen las transformaciones homeóticas producidas por mutaciones en genes *PcG* (Kennison y Tamkun, 1988, Shearn, 1989). Las mutaciones en los genes *trxG* producen fenotipos parecidos a los producidos por la falta de función de varios genes del ANT-C y BX-C (Castelli-Gair y García-Bellido, 1990, Lewis, 1978). En embriones mutantes homocigóticos para el gen *trithorax*, el primer miembro descubierto del *trxG*, se observó una reducción de la expresión de los genes homeóticos dentro de su dominio, lo que produce una transformación de segmentos posteriores en anteriores, (Breen y Harte, 1991, Breen y Harte, 1993, Mazo y cols., 1990).

Hasta el momento, se han caracterizado 20 genes *trxG* (**Tabla 2**) (Kennison, 1993), cuyas proteínas son nucleares y se expresan en todas las células del embrión y los discos imaginales. Las proteínas que forman parte de este grupo son, como en el caso de las proteínas *PcG*, muy heterogéneas, con regiones conservadas como por ejemplo los dominios ARID, SET, PHD, que median las interacciones proteína-proteína (**Tabla 2**). Sólo en el caso de Zeste, GAF y PSQ, se ha visto que interaccionan con secuencias específicas de ADN.

Gen	Drosophila	Vertebrados	Complejo	Dominios/función
<i>Trithorax</i>	<i>trx</i>	MLL/ALL-1	TAC1	SET/Histona metiltransferasa: H3K4
<i>Absent, small, o homeotic discs 1</i>	<i>ash-1</i>	ASH1L	ASH1	SET/Histona metiltransferasa: H3K9, K4; H4 K20
<i>Absent, small, o homeotic discs 2</i>	<i>ash-2</i>	ASH2L	ASH2	PHD finger, dominio SPRY
<i>Brahma</i>	<i>brm</i>	BRG1 HBRM	BRM	La subunidad ATPasa en el complejo Brahma tiene un bromodominio
<i>Osa</i>	<i>osa</i>	ELD/OSA 1	BRM	
<i>Moir</i>	<i>mor</i>	BAF170/BAF155	BRM	
<i>Zeste</i>	<i>z</i>			YGAGYG/ Unión a ADN
<i>Trithorax-like</i>	<i>Trl</i>			secuencia de unión a ADN: GA(n)
<i>Kismet</i>	<i>kis</i>			ADN helicasa, DEDXc, cromodominio, BRK (s1)
<i>Tonalli</i>	<i>tna</i>			SP-RING Zn finger (s2)
<i>Devenir</i>	<i>dev (btl)</i>			tirosin kinasa
<i>Kohtalo</i>	<i>kto</i>		complejo mediador	
<i>Skuld</i>	<i>skd</i>		complejo mediador	

COMPLEJOS PROTEICOS *trxG*

Al igual que en caso de las *PcG*, existen evidencias genéticas de que las proteínas *trxG* actúan de una forma sinérgica y que, además, colocalizan en sitios comunes en cromosomas politénicos, lo que induce a pensar que las proteínas *trxG* actúan mediante la formación de complejos multiméricos proteicos que regulan el mantenimiento de los estados transcripcionalmente activos (Gildea, y cols., 2000, Petruk, y cols., 2001). Se han purificado 4 complejos de embriones de *Drosophila*, todos con diferentes propiedades de modificación de la cromatina: el complejo TAC1, el complejo ASH1, el complejo ASH2 y el complejo BRM (Papoulas y

Tabla 2:
Genes *trxG*, dominios proteicos y complejos a los que pertenecen.

cols., 1998, Petruk, y cols., 2001). El Complejo de Acetilación Trx (TAC1) tiene un peso molecular de 1MDa, contiene las proteínas TRX, dCBP (*Drosophila* sarcoplasmic Calcium-Binding Protein) y Sbf1 (SET domain binding factor1). Debido a la actividad acetil-transferasa de la proteína dCBP, se piensa que dicho complejo puede estimular la transcripción mediante la modificación de los nucleosomas de los genes diana consiguiendo, de esta forma, una mayor accesibilidad de los factores necesarios para la activación (Petruk, y cols., 2001). El producto del gen *ash1* forma parte del complejo ASH1. Tanto la proteína TRX como ASH1 contienen un dominio SET metil-transferasa, siendo su sustrato la lisina 4 de la histona H3. La metilación H3K4 está asociada con cromatina activa (**Figura 12**) (Beisel y cols., 2002, Smith y cols., 2004), parece que ASH1 selectivamente previene la tri-metilación del promotor y de la región codificante asociada al silenciamiento (Papp y Muller, 2006). El complejo ASH2 contiene el producto proteico del gen *ash2* (Simon y Tamkun, 2002).

La proteína BRM (**Tabla 2**) forma parte de un gran complejo multiproteico, el complejo BRM, con un peso molecular de 2MDa. Dicho complejo tiene gran homología con la familia SWI/SNF, complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATPasas de levaduras (Kal y cols., 2000, Papoulas, y cols., 1998). La proteína BRM es la subunidad ATPasa (Khavari y cols., 1993, Muchardt y Yaniv, 1993, Peterson y cols., 1994, Tamkun y cols., 1992). El núcleo del complejo lo forman las subunidades Brama (BRM), Moira (MOR) y Snf5-related 1 (SNR1), las cuales parecen que son requeridas para la actividad remodeladora del complejo, mientras que el resto de subunidades parecen estar más relacionadas con la regulación y la señalización de su actividad (Dingwall y cols., 1995, Phelan y cols., 1999). Se ha demostrado que tanto el complejo BRM como el complejo SWI/SNF permiten la remodelación de la estructura nucleosómica y, por tanto facilitan la unión de activadores y de la maquinaria general de transcripción (Flaus y Owen-Hughes, 2001, Kingston y Narlikar, 1999, Vignali y cols., 2000). La proteína Osa está asociada al complejo BRM (Kal, y cols., 2000) y parece que tiene un papel regulador no esencial en la actividad remodeladora del complejo.

Aunque la mayoría de proteínas de *trxG* no están asociadas al complejo BRM y parecen funcionar de una manera distinta, parece que el principal papel de las proteínas *trxG* es favorecer la accesibilidad de los genes diana a la transcripción, salvando así el efecto represor mediado por los nucleosomas (Papoulas, y cols., 1998).

CONSERVACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PcG Y *trxG* EN LA EVOLUCIÓN

Las proteínas PcG y *trxG* comparten dominios funcionales, pero también contienen regiones divergentes. Uno de las pruebas más estrictas para comprobar la homología funcional es el "ensayo de rescate", donde se intenta rescatar, con una proteína de mamíferos, el fenotipo de una mutación en el correspondiente gen de *Drosophila*. Se ha intentado, sin éxito, el rescate de la letalidad asociada a la mayoría de las mutaciones de los genes *PcG* y *trxG*. Sin embargo, en algunos casos, se ha logrado el rescate parcial de algunos de los fenotipos asociados a mutaciones de los genes *Pc*, *ph*, *pho* y *trx* de *Drosophila* mediante la expresión de los ADNc de *M33*, *mph1*, *YY1* y *MLL*, sus homólogos en vertebrados (Alkema y cols., 1996, Atchison y cols., 2003, Muller y cols., 1995, Muylers-Chen y cols., 2004). Curiosamente, la proteína ESC/EED de humanos, que muestran un elevado grado de conservación con la de *Drosophila*, no es capaz de rescatar ninguno de los fenotipos producidos por mutaciones en el gen *esc* de *Drosophila*, sino que parece actuar como un dominante negativo (Wang y cols., 2000). La falta de rescate de la letalidad o el rescate parcial esta muy probablemente asociada con el método experimental y el promotor utilizado para el mismo además del grado de conservación entre las proteínas (Muylers-Chen, y cols., 2004). En vertebrados no existen homólogos de GAF, Pipsqueak (PSQ) y Zeste, las tres proteínas/*trxG* de *Drosophila* con capacidad de unión a secuencias específicas de ADN, las secuencias (GA)_n del ADN. Además, muy curiosamente, aunque muchos esfuerzos se han invertido en su búsqueda, no se han encontrado las

Gen	Procesos
<i>Polycomb</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclo celular (Martinez y cols., 2006, O'Dor y cols., 2006) • Morfogénesis del SNC (Wang y cols., 2006) • Tumorigénesis (Ferres-Marco y cols., 2006, Goodliffe y cols., 2005) • Transdeterminación en los discos imaginales (Lee y cols., 2005)
<i>polyhomeotic</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferación y diferenciación (Narbonne y cols., 2004) • Morfogénesis del ovario. (Narbonne y cols., 2004) • Morfogénesis del SNC (Smouse y cols., 1988, Wang y cols., 2006) • Ciclo celular (Lupo y cols., 2001, O'Dor y cols., 2006, Martinez y cols., 2006) • Silenciamiento de los genes maternos, "pair rule" y de "polaridad segmental" (Chanas y cols., 2004, Dura y Ingham, 1988, Maschat y cols., 1998, Mckeen y cols., 1994)
<i>Posterior sex combs</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclo celular (O'Dor y cols., 2006) (Lupo y cols., 2001) • Silenciamiento de genes maternos y "pair rule" (Pegri y Lehman, 1994) • Mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre (Kai y cols., 2005)
<i>dRING/Sex combs extra</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferación y diferenciación (Narbonne y cols., 2004) • Morfogénesis del ovario. (Narbonne y cols., 2004) • Meiosis (Balicky y cols., 2003)
<i>Enhancer of zeste</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclo celular (Gatti y Baker, 1989) (O'Dor y cols., 2006). • Desarrollo neuronal. (Wang y cols., 2006) • Tumorigénesis (Ferres-Marco y cols., 2006). • Silenciamiento de los genes "gap" (Pegri y Lehman, 1994)
<i>Extra sex combs</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidad genómica (Holmes y cols., 2006) • Silenciamiento de los "genes de segmentación" (Mckeen y cols., 1994)
<i>Pleiohomeotic</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Silenciamiento de los genes gap (Pegri y Lehman, 1994)
<i>Multiple sex comb</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Supresor de tumores. (Santamaria y Randsholt, 1995) • Hematopoyesis (Remillieux-Leschelle y cols., 2002)
<i>Sex comb on midleg</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Morfogénesis del ovario (Narbonne y cols., 2004) • Diferenciación y proliferación celular (Narbonne y cols., 2004) • Supresión de tumores (Bornemann y cols., 1996)
<i>Additional sex combs</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclo celular (O'Dor y cols., 2006) • Silenciamiento de genes "pair rule" y de "polaridad segmental" (Sinclair y cols., 1992)
<i>Enhancer of Polycomb</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidad genómica (Holmes y cols., 2006) • Silenciamiento heterocromático (Sinclair y cols., 1998)
<i>Suppressor of zeste (2)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Silenciamiento de genes maternos y "pair rule" (Pegri y Lehman, 1994) • Proliferación y viabilidad celular (Boutros y cols., 2004)
<i>Corto</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tumorigénesis (Kodjabachian y cols., 1998) • Ciclo celular, progresión de la mitosis (Kodjabachian y cols., 1998) (Kodjabachian y cols., 1998)
<i>Pipsqueak</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tumorigénesis (Ferres-Marco y cols., 2006) • Ovogénesis (Horowitz y Berg, 1996) (Siegel y cols., 1993) • Desarrollo de fotorreceptores (Weber y cols., 1995)

secuencias PRE y TRE, esenciales en los mecanismos mediados por PcG/trxG en *Drosophila*. Al igual que en *Drosophila*, las proteínas PcG y trxG también actúan antagonicamente en la regulación de los genes Hox en vertebrados. Además las evidencias experimentales emergentes de estudios en células humanas, proponen que las proteínas PcG/trxG intervienen en el control de la proliferación celular y tumorigénesis (Jacobs y van Lohuizen, 2002), una función que se está empezando a describir en *Drosophila*. Por ejemplo, se ha identificado un PRE funcional en el gen que codifica la *ciclina A* (Martinez y Cavalli, 2006) cuya acumulación está reprimida por proteínas PcG. Además, en la **Tabla 3** se muestran los procesos biológicos,

Tabla 3. Procesos biológicos, además del silenciamiento de los genes homeóticos, en los que las proteínas PcG intervienen.

aparte del mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos, donde se ha visto la actuación de los genes del grupo PcG.

GRUPO DE GENES ETP (“Enhancer of trithorax and Polycomb”)

Diferentes estudios genéticos han demostrado que mutaciones en algunos genes, originalmente clasificados como PcG o como trxB, incrementan los fenotipos de las mutaciones trxB o de mutaciones PcG respectivamente, sugiriendo que estos genes son requeridos tanto para la activación como para la represión de los genes homeóticos. Además estudios moleculares también han demostrado que algunas de estas proteínas pueden actuar como PcG y/o trxB dependiendo del contexto celular y del tiempo de actuación durante el desarrollo de *Drosophila*. (Bejarano y Busturia, 2004, Busturia y cols., 2001, Faucheux y cols., 2003, Kal, y cols., 2000, Kennison, 1995, Pirrotta y Rastelli, 1994). Estos genes son los siguientes: *Additonal sex combs*, *Enhancer of Polycomb*, *Enhancer of zeste*, *Posterior sex comb*, *Sex combs on midleg* y *Suppressor (2) of zeste*, *Trithorax-like*, *Zeste* y *batman* (Gildea, y cols., 2000, Horard, y cols., 2000, Kal, y cols., 2000, LaJeunesse y Shearn, 1996, Stankunas y cols., 1998) y se ha propuesto que se agrupen en el conjunto de genes llamados “Enhancer of trithorax and Polycomb” (ETP). El caso, quizás más estudiado ha sido el del factor GAF (Gildea, y cols., 2000), codificado por el gen *Trithorax-like* (Farkas y cols., 1994). Se ha propuesto que GAF tiene un papel en el establecimiento del estado de la cromatina necesario para la regulación de genes por PcG o trxB (Bejarano y Busturia, 2004). Este hecho está apoyado por la observación de que GAF facilita la unión de PHO a un molde de cromatina (Mahmoudi y cols., 2003).

Mecanismos de mantenimiento del estado transcripcional

1. RECLUTAMIENTO DE LOS COMPLEJOS PROTEICOS AL ADN

A pesar de los múltiples estudios realizados, aún se desconoce cómo las proteínas PcG o trxB son reclutadas a los PREs. Hasta el momento se han identificado cinco proteínas con capacidad de unión a una secuencia específica de ADN: PHO, PHOI, Z, GAF y PSQ (Tabla 1 y 2). El modelo más simple para explicar el reclutamiento, postula que un factor de reclutamiento se une directamente con la secuencia del PRE, siendo de este modo, el responsable de la interacción con el resto de las proteínas PcG y trxB (Figura 10). La proteína GAF inmunoprecipita con proteínas PcG además de estar asociada con el complejo PRC2 (Horard, y cols., 2000). La proteína Z está asociada con PRC1 (Kal, y cols., 2000) y la proteína PHO interacciona con ambos complejos (Poux, y cols., 2001). Las propiedades de auto-agregación de las proteínas PcG pueden contribuir al reclutamiento, estando sólo una pequeña fracción del complejo en contacto con los factores reclutadores.

Los sitios de unión a las proteínas PHO y PHO-L se han encontrados en todos los PREs descritos hasta el momento (Misra, y cols., 2001). Las proteínas redundantes PHO y PHO-L son

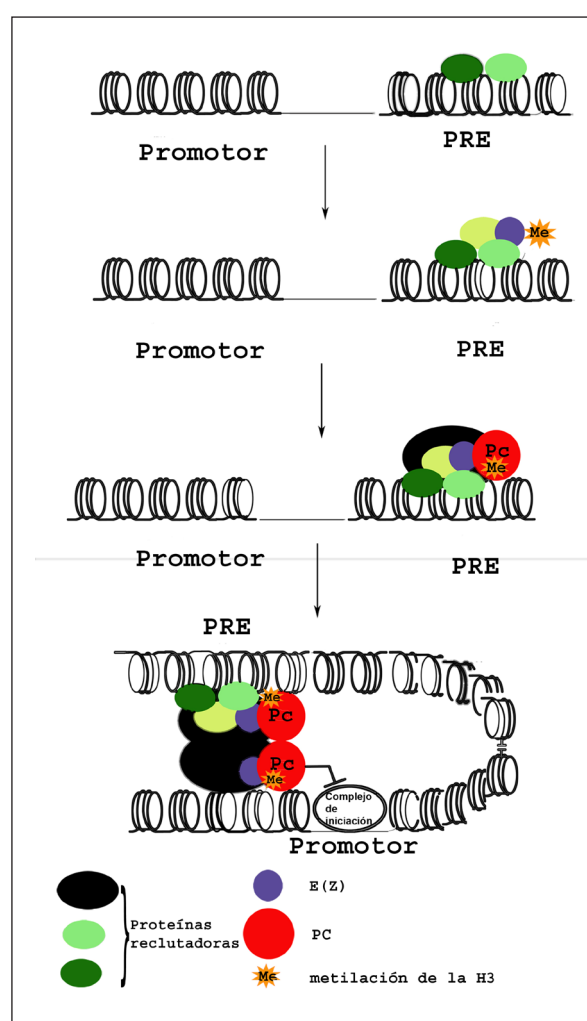


Figura 10 Mecanismo de mantenimiento de la expresión génica mediado por las proteínas PcG/trxB: reclutamiento de los complejos PcG al ADN. Las proteínas reclutadoras como PHO y PHOI entre otras se unen al PRE y reclutarían al complejo PRC2 que contiene E(z).

E(z) metila la lisina 27 de la histona 3 (H3), lo que facilita el reclutamiento del complejo PRC1 por la interacción del cromodominio de la proteína PC. Por un mecanismo desconocido se formaría un loop entre el promotor y el PRE, estabilizado por la dimerización de PC, lo que facilitaría que E(z) siguiera metilando toda la región haciéndolo inaccesible a la transcripción.

las homólogas en *Drosophila* del factor de transcripción de vertebrados YY1 (Brown, y cols., 1998). Su descubrimiento proporcionó un puente entre los complejos PcG y la unión específica al ADN. Se ha propuesto que PHO y PHO-L (Brown y cols., 2003) reclutan PC (del complejo PRC2) sólo en colaboración con E(Z) (del complejo PRC1) (Wang y cols., 2004) (**Figura 10**). Se ha observado que en los dobles mutantes PHO y PHO-L se pierde la unión de PC y E(Z) tanto al PRE como al promotor (Wang, y cols., 2004). YY1 también se asocia tanto a PRC1 como a PRC2 (García y cols., 1999, Satijn y cols., 2001).

Los sitios de unión a ADN de la proteína ZESTE han sido encontrados en varios, aunque no en todos, los PREs y TREs (Mulholland, y cols., 2003). Zeste, perteneciente al grupo ETP, colocaliza con PC, PSC y PH en muchos sitios en cromosomas politénicos (Rastelli, y cols., 1993) y está asociado a PRC1. También interacciona directamente con distintos componentes del complejo BRM y es capaz de reclutar el complejo al gen diana, incrementando la transcripción *in vitro* (Kal, y cols., 2000). La capacidad de ZESTE de formar multímeros y de mediar apareamiento entre PREs de distintos cromosomas indica que puede ser importante en las interacciones entre PRE/TRE, incrementando así la concentración de complejos reguladores.

El factor GAF, codificado por el gen *Trl* (del grupo ETP), también tiene capacidad de unión a ADN específica de secuencia. Estas secuencias de unión se han encontrado en la mayoría de los PREs identificados. Una segunda proteína, Pipsqueak (PSQ), también del grupo ETP, es capaz de unir a los mismos sitios de unión que GAF en el ADN (Lehmann y cols., 1998) (Hodgson y cols., 2001, Huang y cols., 2002). Asimismo, el hecho de que PSQ coimmunoprecipite con GAF (Schwendemann y Lehmann, 2002), sugiere un mecanismo de cooperación entre ambas proteínas en el que GAF podría facilitar el acceso de PSQ al ADN para el posterior reclutamiento de los complejos PcG/TrxG.

2. MODIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA DE LA CROMATINA

Muchos son los esfuerzos dirigidos para intentar descifrar los mecanismos de mantenimiento de un estado transcripcional activado o reprimido a través de las múltiples divisiones celulares que tienen lugar durante el desarrollo. En los procesos de replicación y mitosis, los reguladores transcripcionales se disocian de la cromatina ya que la estructura de ésta se disgrega en este proceso. La mayor parte de las proteínas PcG y trxG están asociadas a la cromatina y, además, se expresan ubicuamente, por lo que deberá existir un mecanismo mediante el cual estas proteínas restablezcan la asociación con los genes diana sólo en las células correctas. Se ha teorizado sobre distintas posibilidades de cómo tiene lugar este proceso. En líneas generales se ha propuesto tres posibles mecanismos del mantenimiento de la represión transcripcional mediada por PcG (**Figura 11**). En la primera, las proteínas PcG actúan como represores mediante la generación de una estructura de la cromatina altamente compactada, de forma que se hace inaccesible a los factores activadores de la transcripción y a la maquinaria de transcripción basal. En el segundo, las proteínas PcG interaccionan directamente con la maquinaria de transcripción e inhiben su función. Por último, también se ha propuesto que las proteínas PcG podrían reclutar los genes que han de permanecer silenciados a unos dominios nucleares específicos

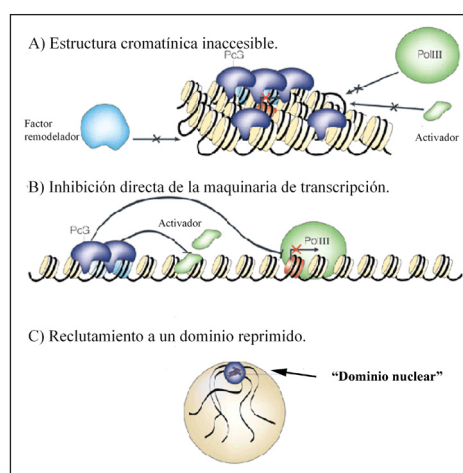


Figura 11. Modelos de los mecanismos de represión transcripcional mediados por los complejos PcG. Modificado de (Francis y Kingston, 2001)

En la primera, las proteínas PcG actúan como represores mediante la generación de una estructura de la cromatina altamente compactada, de forma que se hace inaccesible a los factores activadores de la transcripción y a la maquinaria de transcripción basal. En el segundo, las proteínas PcG interaccionan directamente con la maquinaria de transcripción e inhiben su función. Por último, también se ha propuesto que las proteínas PcG podrían reclutar los genes que han de permanecer silenciados a unos dominios nucleares específicos

en los que se localizan las proteínas PcG. Existen evidencias experimentales para apoyar los tres modelos mecánicos que, en un principio, no son excluyentes. El mecanismo real probablemente incluya una combinación de los tres (**Figura 11**).

Las evidencias experimentales apuntan a que, durante la replicación, el complejo represor/activador señala mediante una modificación covalente en las histonas el re-establecimiento de dicho complejo y por tanto asegura el mantenimiento de los estados transcripcionales reprimidos o activados. La modificación de las histonas juega un importante papel tanto en la activación como en la represión de los genes diana (**Figura 12**). Estas modificaciones

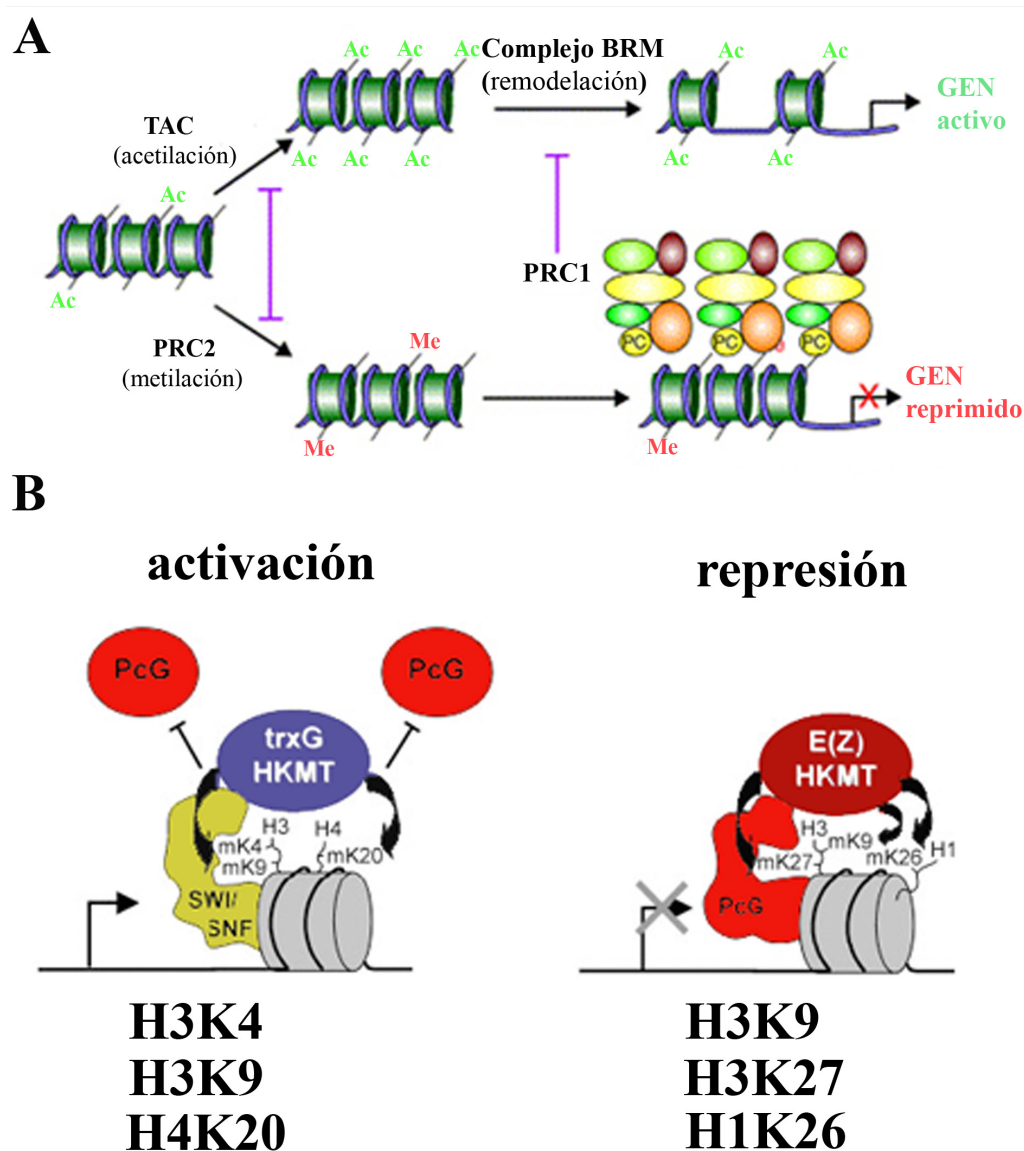


Figura 12. Mecanismo de mantenimiento de la expresión génica mediado por las proteínas PcG/trxG: modificación de histonas.

(A) Esquema de la función de la modificación de histonas en el mantenimiento de la expresión. La acetilación (Ac) de las histonas mediada por el complejo TAC promueve la actuación del complejo BRM, con actividad remodeladora de la cromatina. Se genera una estructura cromatínica óptima para la activación génica. Por otro lado, la metilación (Me) de los nucleosomas por el complejo ESC-EZ (PRC2) y su consecuente de-acetilación promueve el reclutamiento de PRC1, la compactación de la cromatina y por tanto la represión génica (modificado de (Simon y Tamkun, 2002)). (B) La metilación de las histonas puede producir tanto activación como represión génica. En la activación mediada por los complejos trxG, la metilación en las Lisinas (K) K4 y K9 de la histona H3 al igual que la metilación de la Lisina K20 de la H4 son esenciales para el mantenimiento de la activación. En la represión mediada por los complejos PcG, la metilación de las lisinas K9 y K27 de la H3 y la metilación de la lisina K26 de la Histona H1 son esenciales para la represión.

de las histonas proporcionan una marca genética estable frente a la mitosis y meiosis, lo que permitirá a los complejos represores y/o activadores localizar los genes sobre los que deben actuar después de la replicación del ADN. Las modificaciones encontradas hasta el momento, incluyen las metilaciones, las acetilaciones/deacetilaciones y la ubiquitinación (Wang y cols., 2004) de las histonas. La relación entre activación y represión respecto a las distintas modificaciones no está muy bien establecida ya que por ejemplo la acetilación de las distintas Lisinas (K) de las Histonas puede llevar a una activación o a una represión, dependiendo de cual de ellas se modifique (**Figura 12**)

La metilación de las histonas es una marca que puede ser transmitida a través de las divisiones celulares y por el momento no se ha encontrado ninguna actividad histona demetilasa (Kouzarides, 2002). Existe una asociación entre la metilación de H3K4 o H4K20 y la activación transcripcional. También la metilación de las histonas, en concreto de H3K9 o H3K27 (**Figura 12**), está ligada a la represión transcripcional, pero el papel de esta modificación en el silenciamiento es desconocido. Se ha descrito en el complejo PRC2 una actividad metil-transferasa de histonas (MTH). El responsable de la función catalítica MTH es el dominio SET de la proteína E(Z) (Czermin, y cols., 2002, Muller y cols., 2002). También, se ha encontrado que las histonas del gen *Ubx*, cuando está silenciado, está totalmente tri-metilado en la lisina 27 de la H3 (H3K27). Sin embargo las proteínas de PcG, como E(Z) y otras, están localizadas principalmente en los PREs, los cuales son los que menos tri-metilaciones presentan. Parece que el hecho de que los PRE presenten menos me3K27 es debido a la escasez de nucleosomas en estas regiones. Estos datos sugieren que las proteínas del grupo Polycomb son reclutadas a los PRE independientemente de la metilación de histonas y luego escanean la región metilando todos los nucleosomas accesibles (Kahn y cols., 2006).

La acetilación dirigida por las acetiltransferasa de histonas (HATs) (Marmorstein y Roth, 2001, van Lohuizen, 1999) está asociada a la activación génica. La purificación y caracterización del complejo TAC1 muestra una conexión directa entre *trxG* y la modificación de histonas (Petruk, y cols., 2001) ya que el complejo TAC1 contiene la proteína TRX además de otras proteínas entre las que se encuentra la proteína dCBP, con función HAT (Petruk, y cols., 2001). Se ha demostrado que mediante la acetilación de las histonas de los PREs, TAC1 incrementa la accesibilidad de los genes *Hox* a los factores necesarios para la activación (Bantignies y cols., 2000).

Por último, la de-acetilación por las de-acetilasa de histonas (HADCs) también está asociada con represión. La implicación directa de la función HDAC en represión viene dada por los estudios de actividad del complejo PRC2 (Tie, y cols., 2001). La proteína RPD3 y la proteína P55 forman parte del complejo PRC2, RPD3 es una de-acetilasa de la histona 3 de los nucleosomas y P55 es la responsable de mediar la interacción del complejo PRC2 con las histonas.

El gen *dRYBP*

El entendimiento de los mecanismos de mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos requiere el conocimiento de la identidad de los miembros del PcG, al igual que la caracterización de las diferentes interacciones que existen entre los distintos componentes que intervienen en el proceso. Se han realizado numerosas búsquedas genéticas y moleculares para la identificación de nuevas proteínas PcG involucradas en dicho proceso. Una de estas búsquedas se realizó con experimentos de doble híbrido en levaduras para encontrar proteínas que interactuaban con la proteína de ratón RING1 perteneciente a PcG, y homóloga de la proteína SCE de *Drosophila* (García, y cols., 1999). Con estos experimentos se identificó el gen RYBP (Ring1 and Ying-Yang1 Binding Protein) cuya proteína interactúa con RING1 (SCE, en *Drosophila*), con YY1 (PHO, en *Drosophila*) y con M33 (PC en *Drosophila*). Debido a estos resultados y a que la proteína RYBP se comporta como un represor transcripcional

en experimentos de transfección transitoria en células (Garcia, y cols., 1999), se ha propuesto que RYBP pertenece al grupo de proteínas Polycomb.

La proteína RYBP de ratón, también se conoce como DEDAF (Death Effector domain [DED]-Associated Factor) ya que induce apoptosis en tres tipos de células tumorales humanas pero no en células madre mesenquimáticas ni en fibroblastos. DEDAF interacciona con los DED (Death Effector Domains) que se encuentran en la pro-caspasa 8, la pro-caspasa 10, en FADD (FAS-associated Death Domain) y en DEDD (DED-containing DNA-binding protein) (Danen-van Oorschot y cols., 2004) (ver **Figura 59** de discusión).

Debido a que el gen RYBP de ratón se había clasificado como un nuevo gen del grupo Polycomb, y además interaccionaba con proteínas relacionadas en las vías apoptóticas, nos propusimos como objetivo de esta tesis la caracterización funcional genética y molecular del gen homólogo en *Drosophila*, el gen *dRYBP*.

OBJETIVOS

La generación de los patrones morfológicos en el desarrollo de los organismos conlleva la precisa y estricta regulación temporal y espacial de la expresión génica. Son multitud los genes que intervienen en este proceso y una gran variedad de mecanismos moleculares que regulan las respuestas celulares a estímulos extra- e intra-celulares, promoviendo que las células se diferencien, migren, proliferen, paren de dividirse o se mueran. *Drosophila* es un excelente modelo animal para el estudio del desarrollo no solo por sus características vitales y la facilidad de manipulación genética que ofrece, sino también porque tanto los genes de la mosca como los mecanismos de regulación de la expresión génica, están conservados filogenéticamente.

Los patrones de expresión de los genes homeóticos, encargados de la especificidad de la identidad celular, se establecen muy temprano en el embrión, y tienen que ser mantenidos durante todo el desarrollo. Dos grandes grupos de genes, los genes del grupo *Polycomb* (PcG) y los genes del grupo *trithorax* (trxG) se encargan del mantenimiento de la actividad transcripcional génica. Inicialmente descubiertos en *Drosophila* como reguladores de la expresión de los genes homeóticos, se conoce actualmente que los genes PcG y trxG regulan además, el mantenimiento de la actividad transcripcional de un gran número de genes y que tienen papeles importantes en los procesos de hematopoyesis, en mantenimiento de la pluri-potencialidad de las células madre, en el control de la proliferación celular y en la tumorigénesis.

Para poder definir los mecanismos de actuación de las proteínas PcG y trxG es necesario el estudio y la caracterización de los factores que intervienen en los mismos. El objetivo de éste trabajo ha sido la caracterización funcional, genética y molecular del gen *dRYBP* de *Drosophila*, un posible regulador de los mecanismos del mantenimiento de la actividad transcripcional mediado por las proteínas PcG y trxG.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas de moscas y obtención de moscas transgénicas

Las mutaciones en genes del grupo PcG utilizadas fueron: *Pc*³, *pho*¹, *Sce*¹, (Lindsley y Zimm, 1992), el triple cromosoma mutante *Df(2vgD)*, *Asx*^{x¹²³}, *Pcl*^{XM3} que contiene mutaciones en tres genes PcG: *Psc*, *Asx* y *Pcl* y la deficiencia *Df(2R)Pcl*^{I1B} que deleciona el gen *Pcl*. Las mutaciones en genes del grupo trxB fueron: *trxB*^{E2}, *Trl*^{R85}, *Trl*^{I3c} y *Rpd3*^I. Las mutaciones en los genes homeóticos fueron *pbx*¹ (Lewis, 1954), *Ubx*^{I30}.

Para balancear los cromosomas y para distinguir los individuos homocigóticos de los heterocigóticos se utilizaron los siguientes cromosomas balanceadores; *TM6B P[Ubi-GFP] = Hu, e, P[Ubi-GFP] Tb*¹; *TM2 = In(3LR)Ubx*^{I30}, *e*⁵; *MKRS = Tp(3)MRS, M(3)S34, kar, ry*², *Sb, CyO P[Act-GFP] = Cy*¹ *dp*^h *pr*¹ *cn*² y *TM3P[Act-GFP]=In(3LR) TM3, kni*^{I-1} *p*^p *sep*¹ *I(3)89Aa*¹ *Sb*¹ *Ubx*^{bx-34e} *e*¹ *Ser*¹

Las deficiencias *Df(2R) 59AB*, *Df(2R) 58B3-59 A1* *Df(2R) 58D1-59 A1*, *Df(2R) 58C3-7*; *58D6-8*, *Df(2R) 58D6-58F3-5*, *Df(2R) 58B1-2*; *58E3-4*, *Df(2R) 58C3-7*; *58E2*, *Df(2R) 58D2*; *58E1* fueron usadas para el mapeo del gen *dRYBP* y cedidas por el Dr. Orr Weaver. Las líneas GAL4 y las líneas UAS utilizadas en los experimentos de sobre-expresión y cedidas por otros laboratorios fueron: *arm-GAL4* (Sanson y cols., 1996), *en-GAL4* (Brand y Perrimon, 1993), *MD782-GAL4 (Ubx-GAL4)*, *MD719-GAL4 (sd-GAL4)*, *nub-GAL4* (Calleja y cols., 1996), *ci-GAL4* cedida por Dr. R.Holmgren, *nanos-GAL4* (Jenny y cols., 2006) *UAS-osa* (Collins y Treisman, 2000), *TRX-GALDB* (Poux y cols., 2002) y *YY1-GALDB* (Atchison y cols., 2003), *BGUZ* (Muller, 1995) y *BHL4G4* (cromosoma III) (Poux y cols., 2002), *UAS-STG* (cromosoma II) (Neufeld y cols., 1998), *UAS-SC39* (en el cromosoma II) (Parras y cols., 1996), *P[PBXMC138UbxpplacZ]* (Busturia y cols., 2001), *PCNA-GFP* (en el cromosoma III) (Thacker y cols., 2003), *UAS-RNAi_{FADD}M8* (cromosoma II) (Naitza y cols. 2002), *UAS-Diap1* (cromosoma II), *dredd*^{D45} (Leulier y cols., 2000) y *Df(3L)H99*.

Las líneas utilizadas en los experimentos de sobre-expresión y obtenidas en nuestro laboratorio para la realización de este trabajo fueron: *hsp70-GAL4DB dRYBP*, *UAS-dRYBP-T8* (cromosoma II), *UAS-dRYBP-T4* (cromosoma III), *UAS-RYBP* (cromosoma II y III), *UAS-dRYBP-ΔZF* (cromosoma III), *UAS-dRYBP-ZF_{mut}* (cromosoma II), *UAS-dRYBP-ΔCt* (cromosoma III) y *UAS-PC* (cromosoma II y III).

Las cepas utilizadas para la obtención de mutaciones en el gen *dRYBP* y el estudio de su falta de función fueron: *P{SUPor-P}CG12190^{KG08683}/CyO (dRYBP^{KG08683}/CyO* para simplificación) (Bellen y cols., 2004). Las siguientes líneas fueron obtenidas en el laboratorio *UAS-RNAi_{RYBP}-T1*, *UAS-RNAi_{RYBP}-T2*, *UAS-RNAi_{RYBP}-T5* y *UAS-RNAi_{RYBP}-T6* (todas en el cromosoma II) y *UAS-RNAi_{RYBP}-T3*, *UAS-RNAi_{RYBP}-T4*, *UAS-RNAi_{RYBP}-T7* (en el cromosoma III).

Para el intercambio de los elementos P (de Navas y cols., 2006) se construyó el stock *yw; dRYBP^{KG08683}/CyO; hhlacZ/TM2*.

Los stocks utilizados para los experimentos de análisis clonal fueron:

y'w¹¹¹⁸ P[hsp70-FLP122]; FRT{w(hs)G13}y⁺M(2)/CyO
w¹¹¹⁸; P{FRT(w[hs])}G13 P{Ubi-GFP.nls}2R1 P{Ubi-GFP.nls}2R2
w¹¹¹⁸; P{neoFRT}42D P{Ubi-GFP(S65T)nls}2R/CyO
y'w¹¹¹⁸ P[hsp70-FLP122]; P{neoFRT}42D sha/CyO; MKRS/TM2
w¹¹¹⁸; P{neoFRT}42D P{πM}45F M(2)53¹/CyO
w¹¹¹⁸; P{neoFRT}42D p-myc M(2)53¹/CyO
P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}G13 P{w[+mC]=ovoD1-18}2R/T(1;2)OR64/CyO.

Todas aquellas cepas en las que no ha especificado el origen fueron obtenidas de "Bloomington Stock Center". La referencia para la descripción detallada de las cepas se puede consultar en <http://flybase.bio.indiana.edu/stocks>

Para la obtención de moscas transgénicas se siguieron protocolos establecidos (Rubin y Spradling, 1982). Se utilizaron, como huéspedes del ADN foráneo, embriones de la cepa *Df(1)w^{67c23}*, que deleciona los genes *yellow* y *white*. La concentración de ADN que se inyectó es de 0,4μg/μl junto con un plásmido de ADN que codifica para la transposasa a una concentra-

ción de 0,1µg/µl. Las moscas resultantes (generación G0) se cruzaron con los stocks apropiados para la identificación de los individuos transformantes. Para la localización y el balanceo de los transformantes se utilizó el stock: *Df(1)w^{67c23}; If/CyO; TM2/MKRS*.

2. Interacciones genéticas

En el estudio de las interacciones génicas se puso especial cuidado en evitar condiciones de hacinamiento, ya que los fenotipos relacionados con las mutaciones en los genes del grupo PcG y trxB son especialmente sensibles a dichas condiciones. Se analizaron aproximadamente 100 moscas progenie de cada cruce establecido para el estudio de la combinación mutante.

3. Tinción histoquímica con X-Gal (ensayo de la actividad β-galactosidasa).

Técnica utilizada para detectar la expresión del gen marcador *lacZ* (Ashburner, 1989). Para la tinción de discos imaginales y tejidos larvarios, se diseccionaron las larvas en PBS, se fijaron durante 2 minutos en glutaraldehído al 2% en PBS. Después de varios lavados, se incubaron en la solución X-Gal (500 µl de Ferrocianuro Potásico, 500 µl de Ferricianuro Potásico, 8.44 ml de PBS 1X, 300 µl de Tritón X100 al 10%, 250 µl de X-Gal) al 8% en dimetilformamida a 37°C hasta que se visualizó la tinción. La reacción se paró con PBS y el montaje de los tejidos se realizó en glicerol al 87%.

4. Tinciones inmuno-histoquímicas

TINCIÓN DE DISCOS IMAGINALES CON ANTICUERPOS

Los discos se diseccionaron en PBS y se fijaron durante 30 minutos en una solución de fijación (paraformaldehído 4%, 0,1% Triton-X-100, 0,1% de DOC en PBS). Después de varios lavados de 30 minutos, con PBT (PBS 0,1% Tritón -X-100), se bloquearon durante 30 minutos en solución de bloqueo (PBT, 1% de BSA). Todos estos pasos se hicieron a temperatura ambiente (25°C). Los discos se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario en solución de bloqueo. Pasado este tiempo se lavaron tres veces durante 15 minutos con la solución de bloqueo y se incubaron con el anticuerpo secundario durante dos horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios están acoplados a biotina o a un fluoróforo dependiendo del modo en que se quiera analizar la muestra al microscopio (ver más adelante).

TINCIÓN DE EMBRIONES CON ANTICUERPO

Los embriones se recogieron en el estadio apropiado y se decorionaron en lejía durante 2 minutos, se lavaron con agua, se eliminó el exceso de líquido y se recogieron en heptano. Se fijaron durante 20 minutos en agitación en una mezcla de 1ml heptano/ 1ml formaldehído 4%. (Para la tinción con anti-tubulina, la fijación se realizó con formaldehído al 37% durante 20 minutos). Se retiró el fijador (fase inferior) y se desvitelinizaron añadiendo metanol y agitando durante 20 segundos. Después de retirar el heptano, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con metanol y se lavaron para re-hidratarlos 3 veces durante 5 minutos con PBT (Tritón X-100 al 0,3% en PBS) y se bloquearon durante 30 minutos en PBT-BSA (10mg/ml BSA en PBT). Se añadió el anticuerpo primario y se incubó durante toda la noche a 4°C. Se retiró el anticuerpo y se lavó 3 veces durante 10 minutos. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario y se incubó 2 horas a temperatura ambiente.

Para el análisis de las muestras en campo claro se utilizaron los anticuerpos secundarios acoplados a biotina, por lo que después de la incubación de las muestras con el anticuerpo biotilado se lavaron durante 30 minutos en PBT y a continuación se incubaron durante 30 minutos con el complejo ABC (Avidina y Biotina unida a peroxidasa). Después, se lavaron durante 30 minutos en PBT. El revelado se realizó con DAB (Diaminobencina) en presencia de H_2O_2 . El montaje de las muestras se realizó en glicerol, para el análisis inmediato, o en Epón para un posterior análisis.

Para el análisis de las muestras en el microscopio confocal Microradiance se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a un fluoróforo específico (ver más adelante). El montaje de las muestras se realizó en Vectashield.

TINCIÓN DE DISCOS IMAGINALES CON anti-BrdU:

Las larvas se diseccionaron en frío y se incubaron con BrU 0,01 mM durante 11 minutos a 37°C, se lavaron tres veces con PBS, se fijaron durante 2 minutos con Carnoy modificado (3 etanol:1 ácido acético glacial) y se lavaron cuatro veces durante cinco minutos con PBS. Después, se hidrolizaron con HCl 2N durante 10 minutos, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBS y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (BrdU Labelling and Detection Kit I, de Roche). A continuación, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

TINCIONES CON DAPI, DAUNOMYCINE Y TOPRO:

Después de la disección y fijación de las muestras como se ha descrito anteriormente, se incubaron durante 10 minutos con el compuesto correspondiente a una concentración 5µM en el caso del DAPI, 3µM el Topro y 10µM la Daunomycine.

TINCIÓN DE TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labelling):

La tinción con tunel se realiza después de las incubaciones con los anticuerpos primarios y secundarios (como anteriormente se ha descrito). Se incubó la muestra con una solución (495µl de Na-Citrato 100mM, 5µl d TritónX-100 al 10%) durante 30 minutos a 65°C. Después de tres lavados rápidos con PBT, se incubó dos veces durante 5 minutos con 100µl de tampón de dilución de tunel (Roche). A posteriori se incubó con 50µl de solución de marcaje (in situ cell death detection TMR Red kit, Roche) durante 30 minutos a 37°C, se añadió 5µl de enzima (Terminal transferase) y se incubó durante 2 horas a 37°C. Después de tres lavados rápidos a 4°C y cuatro lavados de 15 minutos cada uno a 4°C se procedió al montaje de las muestras.

TINCIÓN CON NARANJA DE ACRIDINA:

Se decorionaron los embriones, se recogieron en un volumen equivalente de heptano y 5µg/ml de naranja de acridina en PBS. Se deja 5 minutos en agitación y se montan en aceite 700 Halocarbon (Abrams y cols., 1993).

Los anticuerpos utilizados fueron:

Anti-dRYBP: desarrollado en el laboratorio en conejo. Usado 1:100 (Bejarano y cols., 2005)

Anti- Ubx: desarrollado en ratón. Usado 1/20 (White y Wilcox, 1984)

Anti- Abd-B: desarrollado en ratón. Usado 1/20 (Celniker y cols., 1990)

Anti- Abd-A: desarrollado en conejo. Usado 1/20 (Macias y cols., 1990)

Anti- Antp: desarrollado en rata. Usado 1/ 1500 (Reuter y Scott, 1990)

Anti- Scr: desarrollado en conejo. Usado 1/100(Bellen y cols., 1989)

Anti-BrdU: Usado 1/10. Roche

Anti- β-Galactosidasa: desarrollado en conejo. Usado 1/2000. (Cappel)

Anti- β-Galactosidasa: desarrollado en ratón. Usado 1/5000. (Promega)

Anti- En: desarrollado en ratón. Usado 1/200 (Patel y cols., 1989)

Anti-ci: desarrollado en rata. Usado 1/50 (Hybridoma Bank).

Anti-Pc: desarrollado en conejo. Usado 1/100 (Wang y cols., 2004)

Anti-Pho: desarrollado en conejo. Usado 1/100 (Brown y cols., 2003)

Anti-Sce: desarrollado en conejo. Usado 1/200. Cedido por Miguel Angel Vidal (Gorfinkel y cols., 2004)

Anti-ftz: desarrollado en ratón. Usado 1/200. (Krause y Gehring, 1988)

Anti-caspasa-3 activada: Desarrollado en conejo. Usado 1/50. (Cell Signalling Technology)

Anti- α tubulina: desarrollado en rata. Usado 1/500. (Serelab)

Anti-Psc: desarrollado en ratón. Usado 1/50. (Hybridoma Bank)

Anti-biotina: desarrollado en ratón. Usado 1/400. (Jackson ImmunoResearch Laboratorios, Inc)

Anti-biotina: desarrollado en rata. Usado 1/400. (Jackson ImmunoResearch Laboratorios, Inc)

Anti-biotina: desarrollado en conejo. Usado 1/400. (Jackson ImmunoResearch Laboratorios, Inc)

Anti-Lissamina Rhodamina: desarrollado en rata. Usado 1/200. (Jackson ImmunoResearch Laboratorios, Inc)

Anti-Rhodamina Red-X: desarrollado en conejo. Usado 1/200. (Jackson ImmunoResearch Laboratorios, Inc)

Anti-Fluoresceína: desarrollado en conejo. Usado 1/200. (Jackson ImmunoResearch Laboratorios, Inc)

Anti-Fluoresceína: desarrollado en ratón. Usado 1/200. (Jackson ImmunoResearch Laboratorios, Inc)

5. Hibridación “in situ” de cromosomas politénicos

De larvas de tercer estadio crecidas a 17°C de los stocks conteniendo las correspondientes deficiencias, se diseccionaron las glándulas salivales en PBS y se trataron como se describe en (Gorfinkel y cols., 2004). Los cromosomas politénicos de las glándulas salivares se prepararon usando la técnica estándar. Las preparaciones se hibridaron con una sonda del gen *dRYBP* marcada con digoxigenina y se detectaron con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a rodamina (James y cols., 1989).

6. Escisión del elemento *P{SUPor-P}CG12190^{KG08683}*

Todos los cruces se hicieron a 25°C en medio de cultivo estándar. Se utilizó el stock *P{SUPor-P}CG12190^{KG08683}/CyO* conteniendo el elemento *P[KG08683]* insertado en el gen *dRYBP* (Bellen y cols., 2004). Como fuente de transposasa se utilizaron las moscas $\Delta(2-3)Dr/TM6B$. Los cruces y los procedimientos de selección se muestran en la **Figura 13**. La detección de las escisiones (revertientes) se llevó a cabo por la pérdida del marcador *white* y *yellow*. Se analizó el fenotipo de los revertientes y se seleccionaron aquellos en los que, o bien en homocigosis o bien en hemizigosis (usando la *Df(2R) 58B3-59*, que entre otros genes, descubre el gen *dRYBP*), presentaban fenotipos morfológicos o letalidad. Para el análisis molecular de las escisiones imprecisas mediante PCR se extrajo el ADN genómico de 50 moscas “revertientes”/ *Df(2R) 58B3-59* en caso de que presentaran letalidad en homocigosis. Se diseñaron y utilizaron fundamentalmente tres oligos (**Tabla 3**): 5'RYBP y 3'RYBP, que en el caso de una escisión precisa amplificaría las 2,4 kb del gen *dRYBP* y, en el caso de escisión imprecisa produciendo una delección parcial del gen, el tamaño de la amplificación por PCR sería más reducido. También, para la detección de escisiones imprecisas que dejen regiones del elemento P insertadas, se utilizó el oligonucleótido interno 5'RYBP_{A'} (**Tabla 3** y **Figura 15**). Se realizó la PCR de ADN

genómico de los revertientes y de una estirpe control *Df(1)w^{67c23}* utilizando "Expand High Fidelity PCR System" (Roche labs) y siguiendo el protocolo en él descrito. Se analizó el tamaño de los fragmentos en un gel de agarosa para su posterior secuenciación. Dicha secuenciación fue realizada en el Servicio de Secuenciación del SIDI, donde se utiliza un secuenciador de ADN Perkin-Elmer modelo ABI PRISM 377.

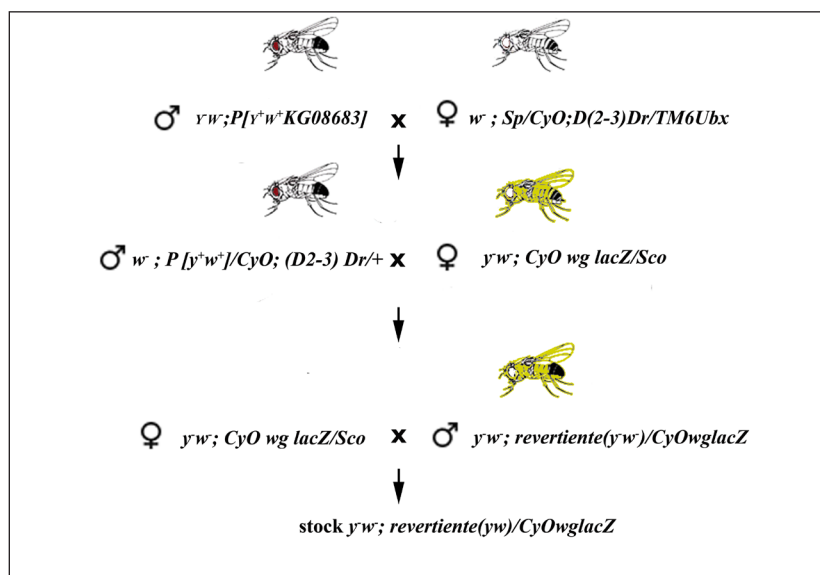


Figura 13. Esquema de los cruces realizados para la escisión del elemento P.

7. Intercambio de elementos P

Se siguió el protocolo proporcionado por Ernesto Sánchez Herrero (de Navas y cols., 2006). Todos los cruces (**Figura 14**) se hicieron a 25°C en medio de cultivo estándar. Los individuos seleccionados por el marcador de ojos ry^+ , $dRYBPlacZ(ry^+)/CyO$; $MKRS/TM2ry$, se tiñeron con anti-βgalactosidasa para estudiar la expresión.

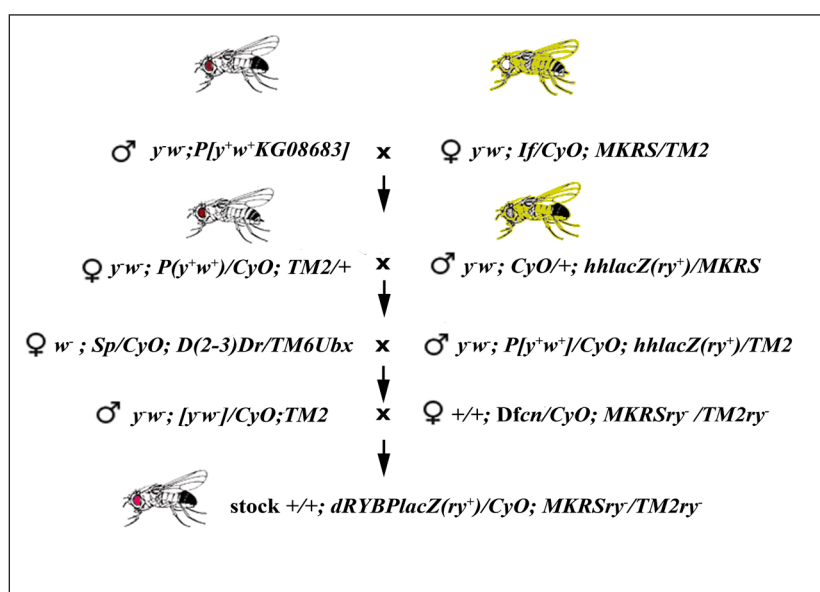


Figura 14. Esquema de los cruces realizados en el intercambio de los elementos P.

8. ARN interferente

La construcción $P[UAS-RNAi_{RYBP}]$ se generó mediante la amplificación por PCR de 480 pb del gen *dRYBP* usando los oligonucleótidos específicos $RNAi_{5'}-dRYBP$ y $RNAi_{3'}-dRYBP$ (**Tabla 3** y **Figura 15**). El producto de PCR se clonó en el vector pGEM-easy (Promega), se extrajo con BamH1-Kpn1 y se clonó en el vector pHBS (Nagel y cols., 2002) dando lugar a $pHBS-dRYBP$, que se cortó con BamH1-Sac1 y se clonó en el vector pBluescript II SK (Stratagene) generando $bs-dRYBP$. El fragmento Intrón-*dRYBP* (que contiene el intrón y el fragmento de 480 pb del gen *dRYBP*) de la construcción $pHBS-dRYBP$ se extrajo con las enzimas Sal1-Kpn1. Asimismo, también se extrajo de la construcción $bs-dRYBP$ el fragmento de 480 pb del gen *dRYBP* con las enzimas Sal1-Kpn1 y se clonaron ambos fragmentos en el vector de expresión pUAST mediante una triple ligación obteniéndose la construcción $UAS-RNAi_{dRYBP}$. Se inyectó esta construcción en embriones *Df(1)w67c23* usando la técnica estándar de microinyección descrita anteriormente. Se obtuvieron 7 líneas (T1 –T7) transgénicas $UAS-RNAi_{RYBP}$ independientes en diferentes cromosomas (ver cepas utilizadas).

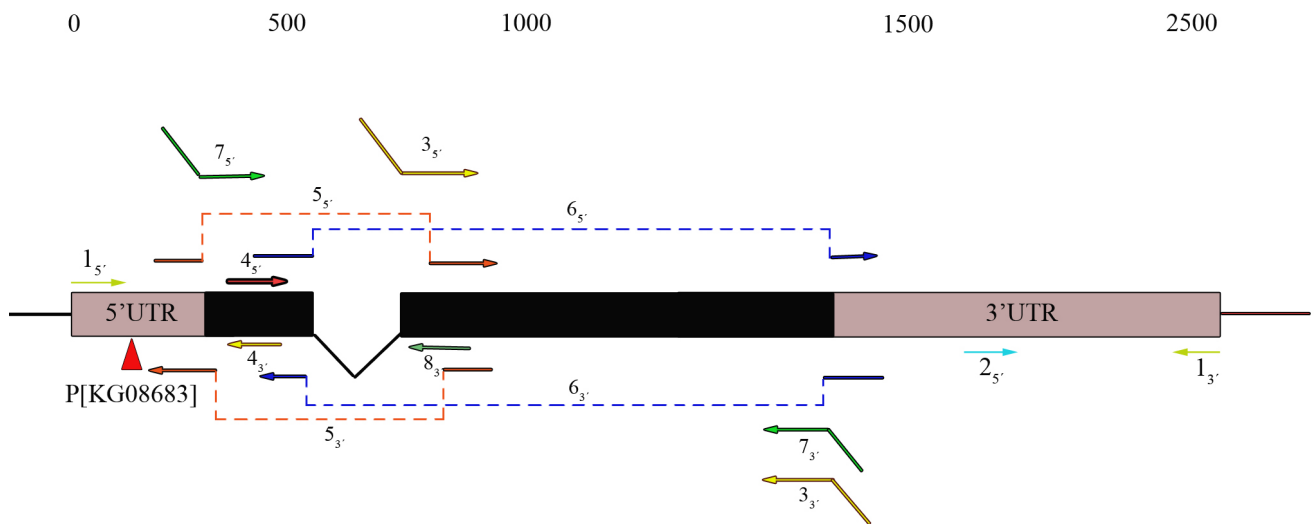


Figura 15. Esquema de los oligonucleótidos utilizados. Cada pareja de oligonucleótidos se representa de un color y se posiciona en la zona donde complementa.

9. Análisis clonal

9.1 Clones de falta de función del gen *dRYBP*

Para la inducción de clones somáticos mutantes para el gen *dRYBP* se utilizó el sistema FLP/FRT (Golic, 1993) (Xu y Rubin, 1993) (**Figura 16**) con y sin la técnica Minute (Morata y Ripoll, 1975). Se construyeron, mediante recombinación, el cromosoma $P[FRT(W^{hs})G13]$, $dRYBP^{KG8683}$ y el cromosoma $P[FRT(W^{hs})G13]$, $dRYBP^{\Delta 16}$. Se cruzaron hembras $yw P[hsp70-FLP122]; P\{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])G13\}$ $P\{w[+mC]=Ubi-GFP.nls\}2R1$ $P\{Ubi-GFP.nls\}2R2$ con machos $P[FRT(W^{hs})G13]$, $dRYBP^{KG8683}$ o con machos $P[FRT(W^{hs})G13]$, $dRYBP^{\Delta 16}$. La progenie fue sometida a choque térmico durante 60 minutos a 37°C a las 0-24, 24-48, 48-72, 72-96 y 96-120 horas después de la puesta del huevo. Los clones mutantes en los discos imaginales están marcados con la falta de expresión de GFP.

Para la inducción de los clones usando la técnica Minute se cruzaron machos del stock $yw P[hsp70-FLP122]; FRT\{w[hs]G13\}y^+M(2)/CyO$ con hembras $P[FRT(W^{hs})G13]$, $dRYBP^{KG8683}$ o $P[FRT(W^{hs})G13]$, $dRYBP^{\Delta 16}$. La progenie fue sometida a choque térmico durante 60 minutos a

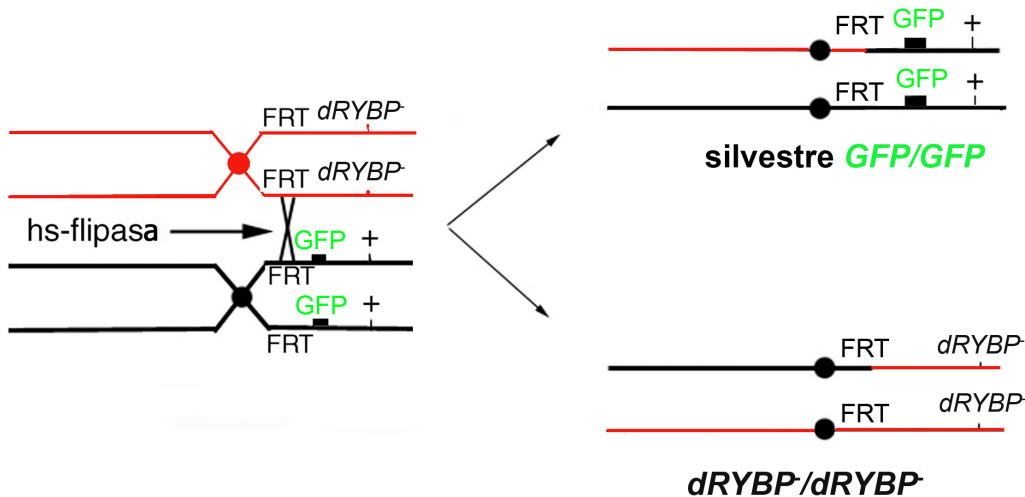


Figura 16. Sistema de formación de clones de recombinación mitótica. Se parte de un individuo que porta la mutación de interés en un cromosoma (en heterocigosis) y en el otro cromosoma homólogo tiene el marcador elegido (en el ejemplo mostrado sería el gen *GFP*). Recombinado con esos elementos, están las secuencias FRT de levaduras en posiciones cercanas al centrómero. Se induce la expresión de la recombinasa de levaduras conocida como flipasa (en este caso bajo el control de un promotor que activa la síntesis en respuesta a un choque térmico). La flipasa actuará uniéndose a las secuencias FRT y provocando la recombinación entre dos de las cromátidas de ambos cromosomas homólogos. Al darse la segregación adecuada en la mitosis se generarán células que son homocigóticas para la mutación a estudiar al tiempo que han perdido el marcador elegido y células que carecen de la mutación (silvestres) y tienen en homocigosis el marcador.

37°C a las 0-24, 24-48, 48-72, 72-96 y 96-120 horas después de la puesta del huevo. Los clones mutantes en la cutícula adulta se identificaron por la ausencia de cerdas cortas asociadas a la mutación *Minute* y por la falta de pigmentación en la cutícula debido a que en la mutación *dRYBP*^{Δ16} el gen *yellow* incluido en *dRYBP*^[KG8683] ha sido deletado.

9.2 CLONES MUTANTES PARA EL GEN *dRYBP* INDUCIDOS EN LA LÍNEA GERMINAL

Se cruzaron hembras *yw*, *P[hsp70-FLP122]; CyO/Sp; TM6B/TM2* con machos *yw; P[FRT(Whs)G13]-dRYBP*^[KG8683]/*CyO*. Se seleccionaron hembras *yw P[hsp70-FLP122]; P[FRT(Whs)G13]-dRYBP*^[KG8683]/*CyO* que se cruzaron con machos *P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}G13 P{w[+mC]=ovoD1-18}2R/T(1;2)OR64/CyO*. Las larvas progenie se sometieron a un choque térmico de 37°C durante 1 hora a las 48-72 y a las 72-96 horas de desarrollo. Las hembras mosaico adultas *yw P[hsp70-FLP122]; P[FRT(Whs)G13]-dRYBP*^[KG8683]/*FRT(w[hs])}G13 P{w[+mC]=ovoD1-18}2R* se cruzaron con machos *Df(2R)58B3-59/CyO* y se estudió el fenotipo de la descendencia.

9.3 CLONES DE SOBRE-EXPRESIÓN DE *dRYBP*

Para realizar los clones de ganancia de función se utilizaron los stocks *yw*^{F36a} *P[hsp70-FLP122]; abx FRT⁺ FRT GAL4 UAS-lacZ/CyO* (de Celis y cols., 1997) y *yw P[hsp70-FLP122]; act-FRT y⁺ FRT GAL4 UAS-GFP/SM5* (Ito y cols., 1997). Hembras *yw*^{F36a} *P[hsp70-FLP122]; abx FRT⁺ FRT GAL4 UAS-lacZ/CyO* se cruzaron con machos *UAS-dRYBPT4/CyO* y la descendencia se sometió a un choque térmico a 34°C durante 15 minutos a las 24-72 horas de desarrollo. Los clones de sobre-expresión se identificaron por la presencia de tricomas y cerdas *forked*. Por otro lado, hembras *yw FLP122; act-FRT y⁺ FRT GAL4 UAS-GFP/SM5* se cruzaron con machos *UAS-dRYBPT4/CyO*. A la descendencia se le sometió a un choque térmico de 34°C durante 10 minutos. Los clones de sobre-expresión se identificaron en los adultos por la falta del marcador *yellow*.

10. Aislamiento de DNA genómico

Se realizó según el protocolo obtenido de Berkeley Drosophila Genome Project (<http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>).

11. PCR inversa

La localización genómica del elemento *P{SUPor-P}CG12190^{KG08683}* (Berkeley Drosophila Genome Project) se realizó según los protocolos encontrados en: <http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>.

12. Construcción de los vectores UAS-RYBP y UAS-PC

El vector p[UAST]-RYBP, se construyó a partir del ADNc de RYBP de ratón, cedido por el Dr. Miguel Angel Vidal (Garcia y cols., 1999), clonado en el vector pGEM-T Easy (Promega labs). Se clonó en el vector p[UAST] (Brand y Perrimon, 1993) en la diana Eco RI generándose el vector p[UAST]-RYBP, que fue inyectado para la obtención de moscas transgénicas según se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron dos líneas UAS-mRYBP independientes localizadas en el cromosoma II y en el III.

El vector p[UAST-PC] se construyó a partir del ADNc de Pc clonado en el vector pGEM-T Easy (de Promega), cedido por el Dr. Miguel Angel Vidal. Se clonó en el vector p[UAST] en la diana Eco RI, obteniéndose el vector p[UAST-PC], que fue inyectado para la obtención de moscas transgénicas según se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron de este modo dos líneas UAS-PC independientes localizadas en el cromosoma II y III.

13. Construcción de proteínas dRYBP mutantes

Las mutaciones puntuales y deleciones seleccionadas se introdujeron en el ADNc de dRYBP clonado en el vector pBluescript II SK (Stratagene) (bs-dRYBP) mediante el sistema basado en la amplificación por PCR (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) utilizando los siguientes oligonucleótidos (**Tabla 3** y **Figura 15**):

- dRYBP_{5'}-ZFmut y su complementaria dRYBP_{3'}-ZFmut para generar la mutación C25A y C28A, molécula de RYBP con las Cys que forman el Zn Finger mutadas puntualmente.
- dRYBP_{5'}-ΔZF y su complementaria dRYBP_{3'}-ΔZF para la deleción de 219 nucleótidos (73 aminoácidos) correspondientes a la zona N-terminal de la proteína que incluye el Zn-Finger.
- dRYBP_{5'}-ΔCt y su complementaria dRYBP_{3'}-ΔCt para la deleción de 315 nucleótidos (105 aminoácidos) correspondientes a la zona C-terminal de la proteína.

Una vez obtenidos todos los ADNc se secuenciaron para la comprobación de la existencia de las mutaciones introducidas.

Los ADNc mutados se clonaron en el plásmido p[UAST] en las dianas NotI y KpnI del mismo. La obtención de las distintas líneas transgénicas se realizó de la forma que se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron dos líneas de dRYBP-ZFmut en el cromosoma II, dos líneas dRYBP-ΔCt en el cromosoma III y una línea dRYBP-ΔZF en el cromosoma III.

Nº	Nombre	Secuencia
1 _{5'}	5'RYBP	5'-AAC ACT GGC TGC GCG TAC TAT CG-3'
1 _{3'}	3'RYBP	3'RYBP, 5'-GCG GGA GAG AAG ACA ACG ACT CC-3'
2 _{5'}	5'RYBP _A	5'RYBPA, 5'-GTT CCA CTA GCA GCG CCC ATC CC-3'
3 _{5'}	RNAi _{5'} -RYBP	5'-CCCGGTACCGGGCTTTAAACGTGG-3'
3 _{3'}	RNAi _{3'} -RYBP	5'-CCCGGATCC AGGAACCTCCACGC-3'
4 _{5'}	dRYBP _{5'} -ZFmut	5'-GAACTTCTGGGAC GGC AGCGT GGC ACATATAGAAAC-3
4 _{3'}	dRYBP _{3'} -ZFmut	5'-GTTTCTATGT GGC GACGCT GGC GTCCCA GAAGTTC-3'
5 _{5'}	dRYBP _{5'} -ΔZF	5'-CCTCTCTCTCTCTGATTATGCCAACGGGAAGTCC-3'
5 _{3'}	dRYBP _{3'} -ΔZF	5'-GGAATCTCCGTTGGGCATAATAC AGGAGGAGAGGAGG-3'
6 _{5'}	dRYBP _{5'} -ΔCt	5'-CATGTGCGACGTGCGGAAAGGAGGGATACAAGGC CTC-3'
6 _{3'}	dRYBP _{3'} -ΔCt	5'-GAGGCCTTGTA TCCCTCTTTCCGCACGTGCGACATG-3'
7 _{5'}	SacI _{5'}	5'-CCCGAGCTCATGGACAAGAAATCC-3'
7 _{3'}	Hind III _{3'}	5'-CCCAAGCTTCCCTCTCTAACTCC-3'
8 _{3'}	RYBP _{5'} RT	5'-TTCCCGTTGGGCATGTTGACACTGGC-3'

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos.

14. PCR cuantitativa

La extracción de ARN, tanto de larvas de primer estadio como de moscas adultas, se realizó mediante la homogenización de las mismas en 300 µl de TRIzol con un Pellet Motor durante 30 segundos con pulsos cortos. Después de la centrifugación durante 3 minutos a 13000 rpm, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml, se añadieron 0.2 volúmenes de cloroformo (200 µl) y se mezcló durante 15 segundos. Se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 minutos, se centrifugó durante 5 minutos. Se traspasó la fase superior a un tubo nuevo con cuidado de no tocar la interfase, se añadió 0.7 volúmenes de isopropanol (350 µl aproximadamente) y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces seguidas. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, se centrifugó durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante con cuidado de no tocar el precipitado del fondo del tubo y se lavó el precipitado con 1 ml de 70% etanol/H₂O-DEPC. Se centrifugó durante 10 minutos y se secó el precipitado al aire. A continuación, se resuspendió en 30 µl de H₂O-DEPC y se guardó a -80°C.

A partir de este extracto de ARN, se llevó a cabo la reacción de transcripción inversa o retro-transcripción durante 2 horas a 37°C según las instrucciones del Kit de (Applied Biosystem). Con el ADNc obtenido, se realizó una PCR con extensión a 60°C con las condiciones universales de las sondas Taqman (Applied Biosystem, número de referencia 137861.2, que híbrida con el final de exón-1 y el principio del exón-2 del CG12190 y que se corresponde con el gen dRYBP)- Para la cuantificación de la expresión del CG13516 situado proximal al gen dRYBP se utilizó la sonda Cyber green.

15. RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

El análisis por RACE para extender el extremo 5' del gen dRYBP se realizó empleando el First Choice RLM-RACE (Ambion) siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial y empleando los oligos 5'RACE Adapter y dRYBP3' RT. (Tabla 3 y Figura 15). Los productos

obtenidos se analizaron por electroforis, se aislaron y se clonaron en pBluescript para su posterior secuenciación.

16. Obtención del anticuerpo anti-dRYBP

El ADNc de dRYBP (LD 18758 Flybase) se clonó en el vector de expresión pQE-30 (Quiagen) en las dianas de restricción, Sac I y Hind III, que se introdujeron en el ADNc con la utilización de los siguientes oligonucleótidos: SacI₅ y Hind III₃. (Tabla 3 y Figura 15) de este modo se obtuvo el vector pQE-30-dRYBP. Se transformaron bacterias E.coli M15 con pQE-30 dRYBP. La inducción, extracción y purificación de la proteína recombinante se realizó siguiendo el protocolo "The QIAexpressionist" (Quiagen). Dos conejos, crecidos en condiciones de completa esterilidad, se inmunizaron con la proteína dRYBP recombinante purificada. Antes de la primera inoculación se extrajo sangre de los animales para obtener el suero pre-inmune, necesario para el control negativo de la especificidad. Para la primera inmunización se utilizó una emulsión de dRYBP purificada (500µg) y adyuvante completo de Freud en PBS, que fue administrada a los conejos mediante inoculación intradérmica múltiple. Transcurridos 3 semanas, se realizó una segunda inoculación emulsionándose la misma cantidad de antígeno (500µg) con adyuvante incompleto de Freud en PBS. Quince días después de cada inoculación se extrajo una muestra de sangre y se analizó la expresión de la proteína dRYBP con el anticuerpo anti-dRYBP mediante tinción histoquímica de embriones *en-GAL4/UASdRYBP* con el fin de estudiar su especificidad. Se realizaron 8 inoculaciones. Quince días después de la última, se sangró a los animales para la obtención del suero final. El suero se incubó 1 hora a 37°C y se dejó toda la noche a 4°C. Se centrifugó a 3000 rpm 15 minutos y al sobrenadante (suero policlonal anti-dRYBP) se le añadió Azida a una concentración 0,03%. El suero obtenido se evaluó por Western-blotting y por tinción inmuno-histoquímica.

17. Western-blotting

Las proteínas se extrajeron de 20 larvas homogenizadas en 100µl de PBS conteniendo inhibidores de proteasas (Complete Mini de Roche). Los restos celulares fueron sedimentados mediante centrifugación a 10000g durante 5 minutos. La concentración de proteínas de los extractos fue cuantificada por colorimetría (Protein assay, Biorad). Se separaron 40µg de proteína total mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham). La membrana se bloqueó durante 1 hora en tampón TBS (25mM Tris-HCl pH 7,5, 137mM NaCl) con un 5% de leche desnatada en polvo. Después se incubó a 4°C con una solución de IgGs anti-dRYBP en TBS (1:500) durante toda la noche en agitación. Después de 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS, se incubó con una solución 1:10000 en TBS del anticuerpo secundario (anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, después de 20 minutos de lavados con TBS, se visualizaron las bandas inmuno-reactivas con la utilización del sistema ECL (Amersham) y autorradiografía.

18. Ensayos de Co-inmunoprecipitación

Se homogenizaron embriones progenie del cruce *UAS-dRYBPxarmGAL4* en un tubo eppendorf con 250µl de buffer de inmunoprecipitación (NaCl 150mM, Tris pH 7,4 10mM, EDTA

1mM, EGTA pH 8, NP40 0,5%, TritónX100 1%, inhibidores de proteasas). Se dejó agitando en hielo durante 30 minutos, se centrifugó durante 15 minutos a 13k, se recogió el sobrenadante, y se midió la concentración de proteína. Se guardaron 15µl del sobrenadante a -70°C como control de extracción. Del resto del sobrenadante se cogió la cantidad necesaria para tener 400µg de proteína total, que se incubó en agitación a 4°C durante toda la noche con 25µl de BSA 10mg/ml y 2-5µg del anticuerpo (policlonal) de elección. Al día siguiente, se añadieron 30µl de bolitas de proteína A sepharosa de *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich) en PBS y se incubó durante 2 horas agitando a 4°C. Pasado este tiempo se centrifugó durante 5 minutos a 1k y se retiró el sobrenadante guardando 15µl de éste a -70°C como control de la unión a proteína A sepharosa. Las bolitas de proteína A sepharosa se lavaron 4 veces, mediante agitación y centrifugación durante 5 minutos a 1k con 1ml de buffer de inmunoprecipitación. Después de los lavados, se prepararon las muestras para el análisis por western blotting. Para ello las bolitas de proteína A sepharosa se resuspendieron en 30µl de buffer de carga 2x y a los controles se les añadió 15µl de buffer de carga 2x. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se cargaron en un gel de acrilamida al 15%.

19. Ensayos de “Pull-down”

Por un lado, se preparó un extracto de proteínas de moscas silvestres como se ha descrito anteriormente. Por otro lado, se purificó la proteína dRYBP en condiciones nativas según el protocolo 12 de “The QIAexpressionist”. Además, se lavó 3 veces 30µl Ni-NTA Agarosa con buffer de lisis compuesto de una tableta de inhibidores de proteasas (Complete Mini de Roche) y NP40 1%. en PBS) y se centrifugó durante 1 minuto para precipitar la agarosa. Se añadieron 10µg de la proteína previamente purificada en estado nativo a los 30µl Ni-NTA Agarosa previamente lavados y se incubó 1 hora a 4°C. Pasada este tiempo de incubación se añadieron 300µg del extracto de proteínas y se incubó toda la noche a 4°C. Se centrifugó 1 minuto a 1K y se lavó 5 veces con PBS 0,5M NaCl para eliminar proteínas que se habían unido de manera inespecífica. Se lavó con Tris pH 6,8 100mM, se separaron las proteínas unidas Ni-NTA Agarosa por electroforesis y se identificó por Western Blotting con el anticuerpo.

20. Expresión ectópica

Para los experimentos de sobre-expresión de genes o de minigenes se utilizó el sistema GAL4/UAS (Brand y Perrimon, 1993). Con este sistema se puede controlar la sobre-expresión en distintos tiempos del desarrollo y en diferentes regiones del cuerpo utilizando una gran variedad de líneas GAL-4 (ver cepas utilizadas). La sobre-expresión fue realizada a 25°C y a 29°C.

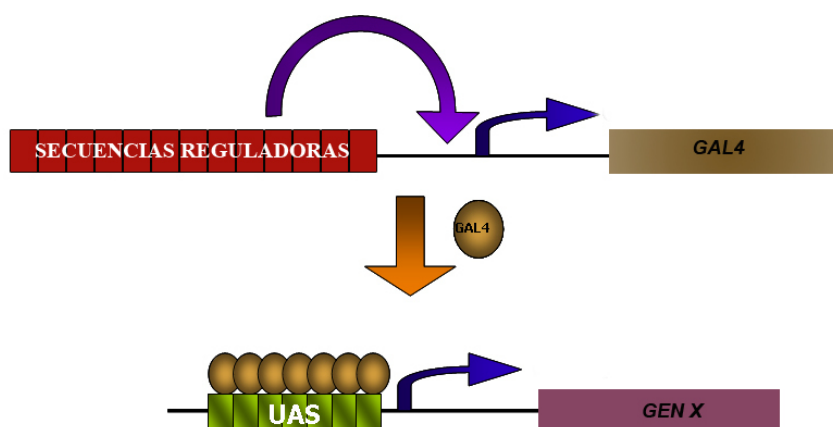


Figura 17.
Sistema Gal4/UAS. La expresión temporal y espacial de la proteína GAL4 está bajo el control de las secuencias reguladoras (rojo) del gen donde se ha insertado. Al unirse a las secuencias UAS (verde) se produce la expresión del gen de nuestra elección (GEN X).

21. Expresión ectópica de dRYBP-GALDB

Se realizaron puestas de 1 hora del cruce de moscas transgénicas *P [hsp70 dRYBP-GAL4DB]/ P [hsp70 dRYBP-GAL4DB]* con moscas *P[BHL4G4PRE]/ P[BHL4G4PRE]* o con moscas *P[BGUZ]/ P[BGUZ]*. Los embriones se dejaron desarrollar a 25°C durante las 2 horas siguientes. A continuación se les sometió a un tratamiento de choque térmico a 37°C durante 1 hora y se dejaron desarrollar durante 12 horas a 18°C hasta aproximadamente el estadio 14 para *BHL4G4PRE*, o hasta el estadio 18 para *BGUZ*, del desarrollo embrionario (Campos-Ortega y Hartenstein, 1985). Después, los embriones se recolectaron, se fijaron y se tiñeron de la forma descrita previamente para observar el gen marcador *lacZ*. Como control, los embriones *P [hsp70 TRX-GAL4DB]/+*; *P[BHL4G4PRE]/+* se trataron como se describe en (Poux y cols., 2002). La actividad transcripcional de dRYBP durante el desarrollo de los discos imaginales se analizó en moscas *P [hsp70 dRYBP-GAL4DB]/ P [hsp70 dRYBP-GAL4DB]* cruzadas con moscas *P[BHL4G4PRE]/ P[BHL4G4PRE]* o con moscas *P [GALBS-lacZ]/ P [GALBS-lacZ]*. La progenie fue sometida a una serie de choques térmicos a 37°C durante 60 minutos cada día. Las larvas de tercer estadio se diseccionaron y se tiñeron con X-GAL según el protocolo descrito anteriormente. Para estudiar la represión transcripcional en fondo mutante PcG se cruzaron moscas *P [hsp70 dRYBP-GAL4DB]/ P[BHL4G4PRE]* con moscas *Pc³/TM6B* o *Sce¹/TM6B* o *pho¹/ci^D*. Las larvas progenie de este cruce se trataron como se describe anteriormente.

22. Preparación de cutículas adultas y larvarias

Para la preparación de cutículas adultas, las moscas o las partes diseccionadas de las mismas se calentaron en KOH al 10% durante 3 minutos a 90°C. Una vez retirada la grasa de las muestras, se lavaron en H₂O, se deshidrataron en alcohol absoluto y después en propanol. El montaje de las muestras se llevo a cabo en Euparal.

Para la preparación de las cutículas larvarias de embriones que se han desarrollado durante 24 horas, se recolectaron los embriones, se decorionaron con lejía y se desvitelinizaron en una solución 1:1 metanol:heptano. Se eliminó la fase superior, se lavaron con metanol y se hidrataron con PBS. Las larvas se montaron en *Hoyer* conteniendo ácido láctico y las preparaciones se incubaron a 65°C durante toda la noche.

RESULTADOS

El gen *dRYBP* de *Drosophila melanogaster*

Mediante la búsqueda de un gen homólogo al gen RYBP de ratón (García y cols., 1999) en la base de datos del genoma de *Drosophila melanogaster* se identificó el gen *dRYBP*. El genoma de *Drosophila melanogaster* contiene un único gen *dRYBP* (Flybase CG12190) (Adams y cols., 2000) de un tamaño de 2,4 Kb y localizado citogenéticamente en la región 58F7 (AE003458, scaffold versión 4.3) (**Figura 24**) del brazo derecho del cromosoma 2. El gen está compuesto de dos exones (**Figura 18**). Estábamos interesados en averiguar si existían varios ARN mensajeros. Para ello se realizaron estudios de RACE en este trabajo de tesis (ver más adelante y Materiales y Métodos), los cuales indicaron que en las moscas salvajes se produce un único transcrito dando lugar a una sola proteína.

La proteína *dRYBP* de *Drosophila melanogaster*

La proteína *dRYBP* está constituida de 150 aminoácidos (18KD) (**Figura 18**). La búsqueda de dominios conservados (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) predijo la existencia de un dominio "Zinc finger" del tipo C_2-C_2 (Meyer y cols., 2000) en el extremo amino terminal entre los residuos 21 y 43 de la proteína. El extremo carboxilo terminal, donde se ha encontrado (García y cols., 1999) que la proteína RYBP de ratón interacciona con las proteínas RING1A, RING1B, PC y YY1, (SCE, PC y PHO en *Drosophila* respectivamente), no muestra homología estructural con ningún dominio proteico conocido.

La proteína *dRYBP* está conservada evolutivamente desde el gusano *Ciana ascaralis* hasta humanos (**Figura 18**). En humanos, existen dos proteínas RYBP muy relacionadas entre sí que son DEDAF/YEAF-1 (Death Effector Domain Associated Factor/YY1 and E4TF1/hGABP-Associated Factor-1) y YAF-2 (YY1 Associated Factor-2) (Zheng y cols., 2001). De la misma forma, en ratón también existen dos proteínas muy similares RYBP y YAF-2 (Sawa y cols., 2002). Los resultados de la comparación de los aminoácidos de *dRYBP* con los de las proteínas RYBP de otras especies (usando el programa Multialin, www.toulouse.inra.fr/multalin.html) (**Figura 18**) indican un alto grado de homología tanto en el extremo C-terminal como en el N-terminal. El dominio N-terminal muestra un gra-

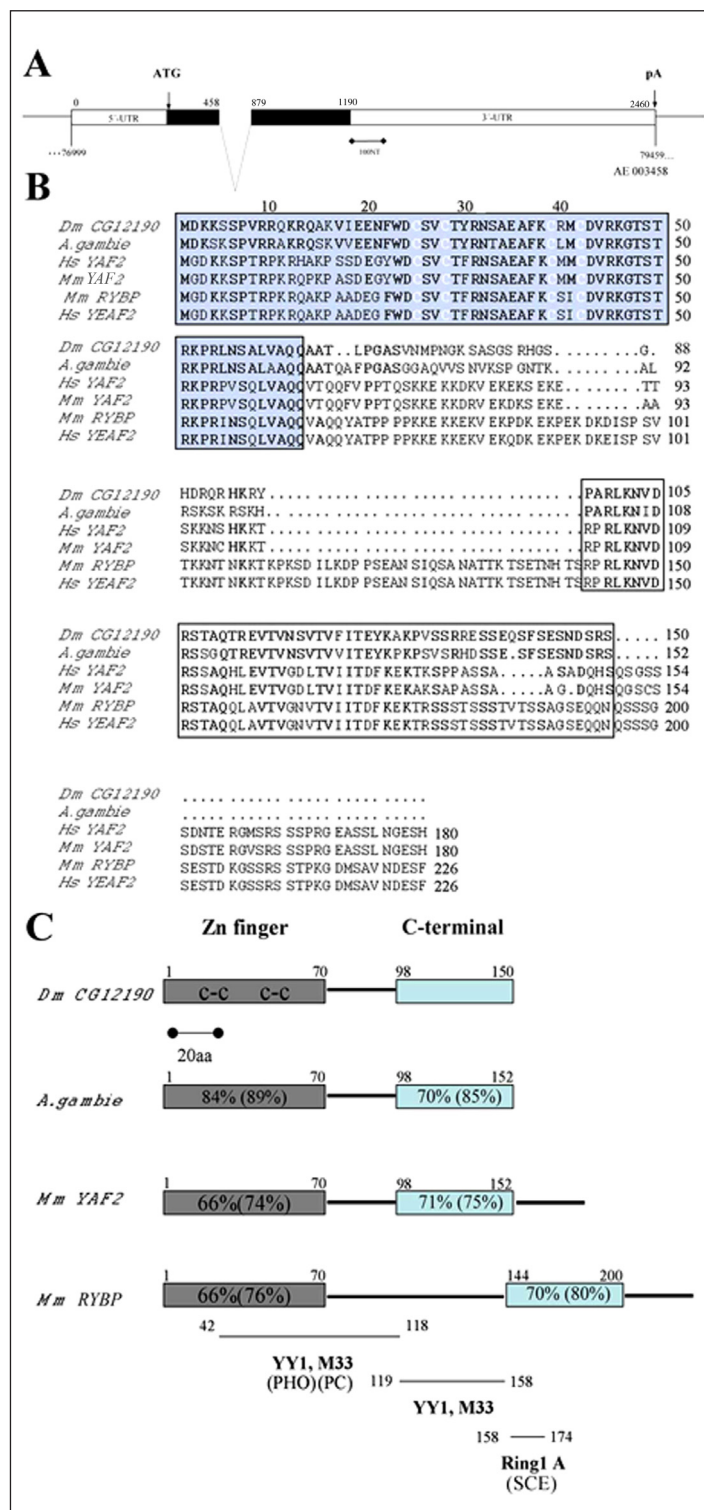


Figura 18. El gen *dRYBP*. (A) Estructura del gen *dRYBP* (CG12190). Se indica el intrón (línea), los exones (cajas negras) y el poli-A (pA). (B) Comparación de secuencias de la proteína *dRYBP* con sus correspondientes ortólogos. Los rectángulos indican las homología encontradas en el Zn-Finger (azul) y en el C-terminal. (C) Esquema de las proteínas RYBP en distintas especies indicando el porcentaje de identidad y, entre paréntesis, el porcentaje de homología, entre los aminoácidos. Abajo se indica dominios de de interacción de la proteína RYBP con las proteínas PcG murinas. Entre paréntesis se indica los nombres de las correspondientes proteínas en *Drosophila*.

do de similitud del 76% con un 67% de los residuos idénticos. El dominio C-terminal muestra un grado de similitud del 70% con un 80% de aminoácidos idénticos (**Figura 18**).

Estudio de la expresión de la proteína dRYBP

Se realizó el análisis de RACE (ver Materiales y Métodos) en embriones silvestres para estudiar el tamaño y el número de transcritos. Se observó que únicamente existía un ARNm (**Figura 19**). Para el estudio de la expresión de la proteína dRYBP en los diferentes tejidos y a lo largo de todo el desarrollo de la mosca, se obtuvo un anticuerpo anti-dRYBP desarrollado en conejo (ver Materiales y Métodos). Para comprobar si el anticuerpo anti-dRYBP era capaz de reconocer a la proteína dRYBP, se sobre-expresó la proteína dRYBP usando la línea de moscas *en-GAL4* y las moscas transgénicas *P[UAS-dRYBP]* obtenidas en el laboratorio (ver Materiales y Métodos) (Bejarano y cols., 2005). Se observó que la expresión de dRYBP detectada con el anticuerpo en los embriones *enGAL4>UASdRYBP* aparecía altamente enriquecida en el dominio *engrailed* (datos no mostrados). También se comprobó por “western-blotting” de extractos proteicos obtenidas de larvas que el anticuerpo anti-dRYBP reconocía una banda de 18KDa que se corresponde con el peso molecular predicho para la proteína dRYBP (datos no mostrados).

Se estudió la expresión de la proteína en todos los tejidos y a lo largo de todo el desarrollo de la mosca. (**Figura 19**). Se observó que la expresión es ubicua en todos los estadios del de-

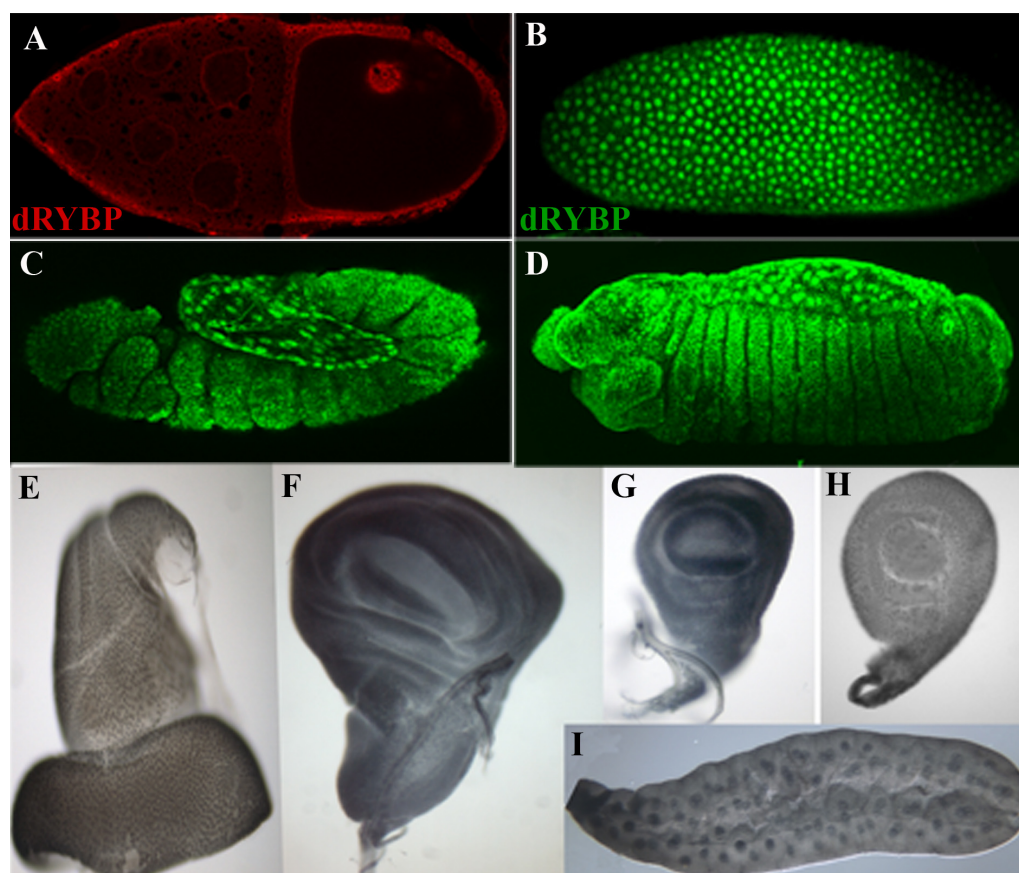


Figura 19. Expresión de la proteína dRYBP durante el desarrollo. (A) Cámara de huevo en estadio 10 mostrando expresión (rojo) en el núcleo del oocito. (B-D) Expresión nuclear y ubicua durante la embriogénesis. (B) Embrión Blastodérmico. (C) Embrión estadio 11. (D) Embrión estadio 14. (E-I) Expresión nuclear y ubicua en los discos imaginales de ojo-antena (E), ala (F), halterio (G), pata meta-torácica (H) y glándulas salivales (I).

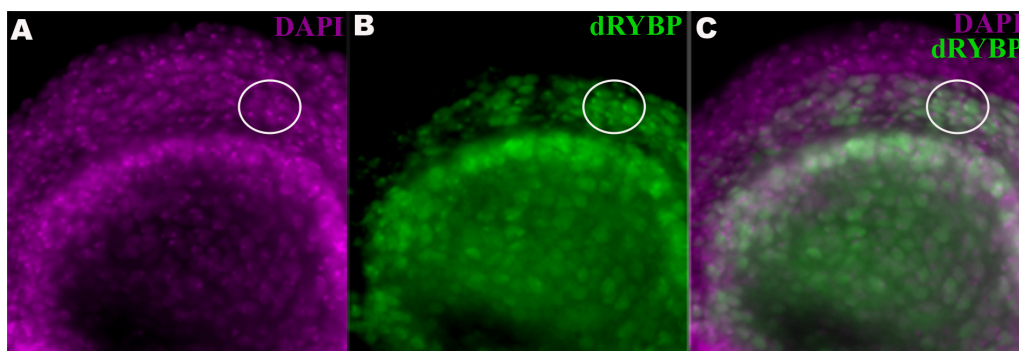


Figura 20. Expresión sub-nuclear de dRYBP en el disco imaginal de ala (A) Tinción con DAPI (morado) que marca la heterocromatina. (B) Expresión de la proteína dRYBP en verde. (C) Superposición de las imágenes.

sarrollo, como se había observado previamente en el laboratorio mediante experimentos de hibridación “in situ” (Bejarano y cols., 2005), indicando que no existe regulación post-transcripcional de su expresión. Además, mediante el uso del anticuerpo anti-dRYBP, se observó que la expresión es nuclear y que comienza muy temprano en el desarrollo, pudiéndose detectar en el núcleo del oocito y a muy altos niveles en los embriones tempranos, sugiriendo un requerimiento materno de la proteína.

En interfase la expresión de la proteína dRYBP aparece en una región nuclear discreta donde se observa un patrón punteado con altos niveles de expresión. Para investigar la localización subnuclear se tiñeron discos imaginales con DAPI, que marca más fuertemente las regiones de heterocromatina (Schweizer, 1981). Se observó que la expresión de DAPI y la expresión de dRYBP no se superponían, indicando que dRYBP estaba excluida de la región más condensada del ADN en núcleos en interfase (**Figura 20**). Para estudiar si la localización

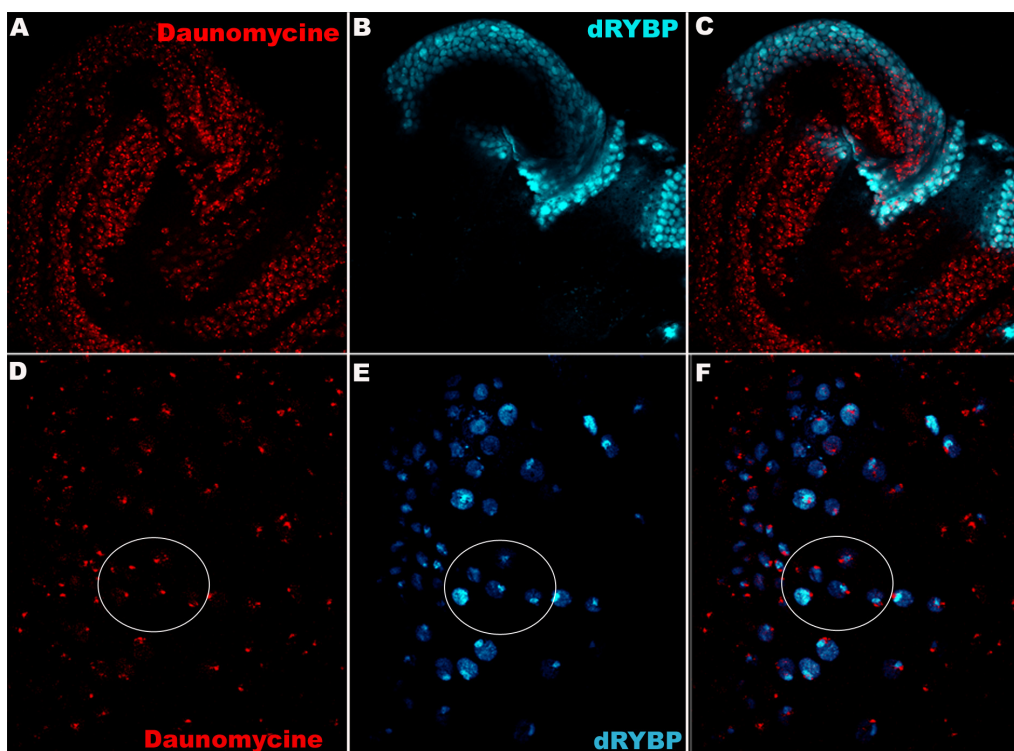


Figura 21. Expresión sub-nuclear de dRYBP en el disco imaginal de ala enGAL4/UAS-dRYBP. (A) Tinción con Daunomycine (rojo) que marca el nucleolo. (B) Expresión de la proteína dRYBP (azul) en el compartimento posterior del disco. (C) Superposición de las imágenes. (D-F) Detalle a más aumento de la tinción con Daunomycine (rojo) y anti-dRYBP (azul).

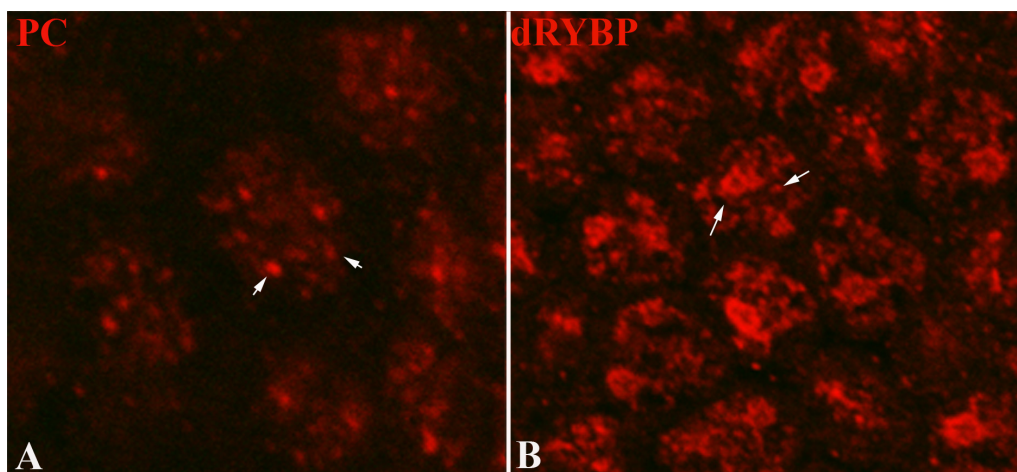


Figura 22. Expresión subnuclear de las proteínas Polycomb y dRYBP. Cuerpos Polycomb. (A) Expresión sub-nuclear de la proteína Polycomb en células de cerebro larvario. (B) Expresión sub-nuclear de dRYBP en células embrionarias.

era nucleolar, se realizaron tinciones dobles con Daunomycine y anti-dRYBP y con TOPRO y anti-dRYBP. Como se observa en la **Figura 21**, no se detectó colocalización de dRYBP ni con Daunomycine, ni con Topro, ambos marcadores nucleolares (Kiernan, 2001).

La expresión de dRYBP muestra una distribución nuclear muy similar a la observada para las proteínas PcG que han sido analizadas en detalle (Buchenau y cols., 1998) (**Figura 22**). Se ha descrito, que la expresión de PC y de PSC está excluida de la heterocromatina y del nucléolo, mostrando un patrón de puntos en el núcleo, (Buchenau y cols., 1998). Estas acumulaciones nucleares de las proteínas PC y PSC se han denominado “Cuerpos PcG” (Saurin y cols., 1998). Mediante experimentos de dobles tinciones por un lado con anticuerpos anti-PC y anti-dRYBP y por otro lado con anticuerpos anti-PSC y anti-dRYBP, se ha investigado si dRYBP podría localizarse nuclearmente en los “Cuerpos PcG” Desafortunadamente no hemos sido capaces de llegar a una conclusión con el anticuerpo anti-PC, ya que ambos anticuerpos (anti-PC y anti-dRYBP) están desarrollados en las mismas especies, haciéndose muy difícil discernir entre si la señal se corresponde con uno u otro anticuerpo. Tampoco se ha conseguido concluir si dRYBP se localiza en los “cuerpos Pc” mediante el uso del anticuerpo anti-PSC.

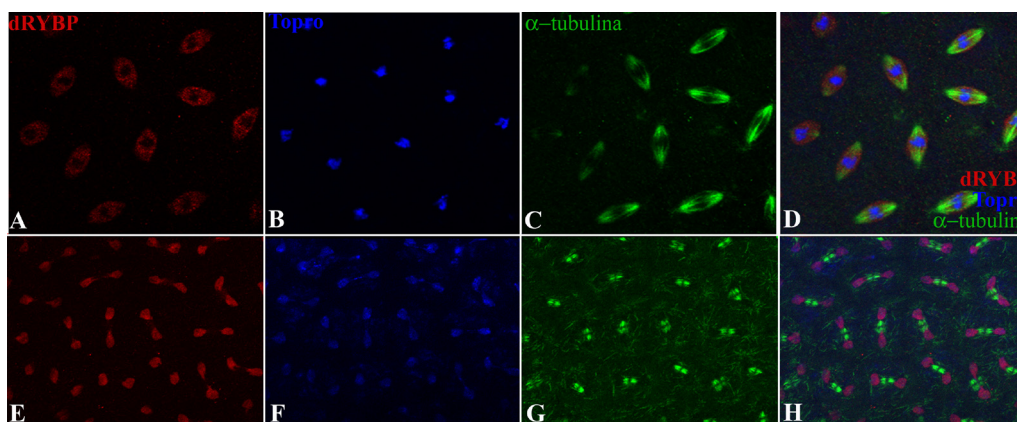


Figura 23. Distribución de la proteína dRYBP durante las divisiones del sincitio embrionario. Panel superior (A-D) Metafase temprana: (A) Distribución de dRYBP (rojo), (B) To-pro-3 marcando el ADN (azul). (C) α -tubulina marcando el uso mitótico (verde), (D) Superposición de las imágenes. Panel inferior (E-H) Anafase. (E) Distribución de dRYBP (rojo), (F) To-pro-3 marcando el ADN (azul), (G) α -tubulina marcando el uso mitótico (verde), (H) Superposición de la imágenes.

También se estudió la expresión de la proteína dRYBP durante las divisiones nucleares en embriones sincitiales tempranos (0-4 horas). Se observó que durante la mitosis la proteína dRYBP se disocia de la cromatina en profase, quedando visiblemente fuera de la cromatina en metafase (**Figura 23A**) y reasociándose con la cromatina en anafase (**Figura 23B**), estando totalmente unida en telofase. Este patrón de expresión dinámico de la proteína dRYBP coincide con los patrones de expresión de otras proteínas PcG, como la proteína PSC (Buchenau y cols., 1998).

Análisis funcional del gen *dRYBP*

Cuando se empezó a realizar este trabajo, no se disponía de ninguna inserción de elementos P mapeados en el gen *dRYBP*, ni en la zona genómica cercana. Ya que se había descrito que RYBP de ratón interaccionaba físicamente con proteínas PcG (García y cols., 1999), elegimos de la colección de stocks de Bloomington (Flybase) una serie de Elementos P y de Deficiencias de la región donde *dRYBP* estaba citogenéticamente mapeado. Estos fueron P[12060 (58F1-2)], P[10584 (58F-59A)], P[10482 (58F4-5)], P[12485 (58F-59A)], P[11217 (58F4-5)], P[12669 (58F4)], P[11756 (58F5-10)], P[10471 (59A1-3)] y Df(2R) 59AB, Df(2R) 58B3-59A1 y Df(2R) 58D1-59A1, con el propósito de investigar si alguno de ellos o en combinación con mutaciones del grupo PcG y *trxG*, producía fenotipos indicativos de la existencia de un gen tipo PcG o de tipo *trxG* en la zona cromosómica donde el gen había sido mapeado, (inicialmente 58F4, actualmente 58F7). Como controles se usó Df(3R)P52, que descubre el gen *trithorax* del *trxG*, y la Df(2R)Pcl^{11B}, que descubre el gen *Polycomb-like* de la familia PcG.

El análisis se realizó estudiando la complementación, los fenotipos en la cutícula larvaria, los fenotipos en la cutícula adulta y la expresión embrionaria de las proteínas homeóticas UBX y ABD-B. Esto se llevó a cabo en combinaciones genéticas de deficiencias homocigóticas, de deficiencias doble heterocigóticas, de los elementos P con las deficiencias y de las combinaciones de las mutaciones *Pc*³ y *trx*^{E2} con las deficiencias. Debido a que las deficiencias eran relativamente grandes, los fenotipos larvarios eran difíciles de interpretar, así como la expresión de las proteínas homeóticas. Tampoco el estudio de los fenotipos producidos por

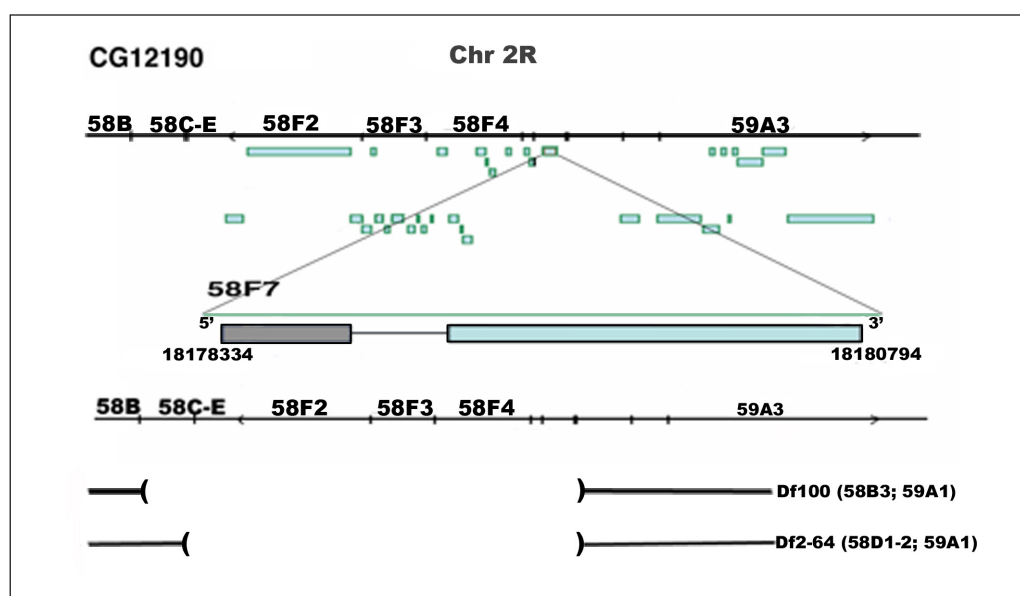


Figura 24. Esquema de la región genómica del CG12190, correspondiente al gen *dRYBP*. En la parte inferior se muestran la extensión de las dos deficiencias que delecionan el gen *dRYBP* utilizadas en este trabajo.

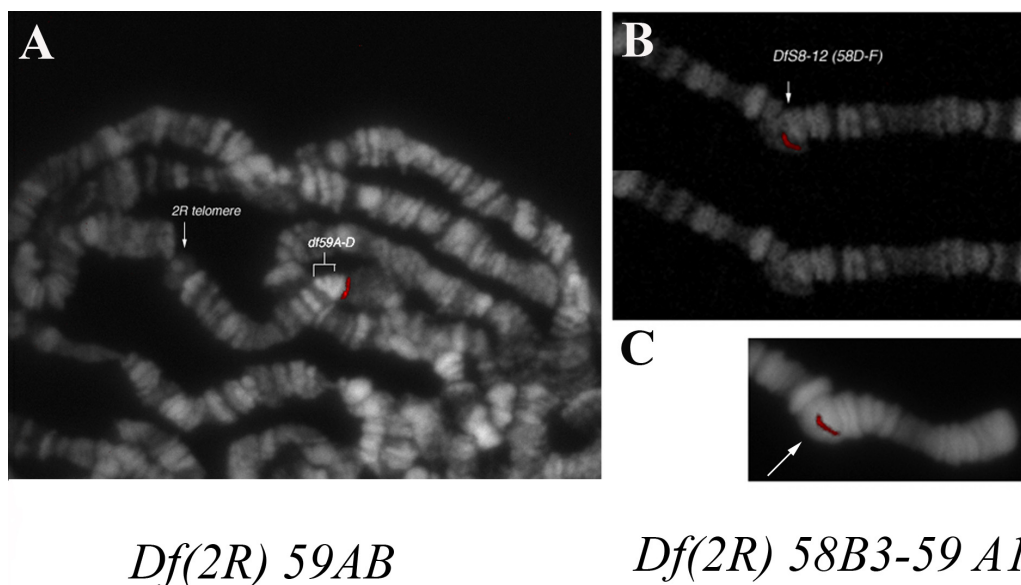


Figura 25. Mapeo del gen *dRYBP* mediante hibridación “in situ” en cromosomas politénicos. (A) Cromosomas politénicos de la deficiencia *Df(2R) 59AB/+*, la sonda de *dRYBP* (rojo) hibrida fuera de la región donde se localiza la deficiencia. **(B)** Cromosoma politénico de la deficiencia *Df(2R) 58B3-59 A1/+*, *dRYBP* hibrida en la región genómica que descubre la deficiencia.

las combinaciones de los elementos P con las deficiencias o de las combinaciones de las deficiencias produjo ningún resultado concluyente.

Por otro lado se realizaron hibridaciones *in situ* a cromosomas politénicos de las deficiencias, usando como sonda el gen (o el ADNc) *dRYBP*, para saber exactamente cual de las deficiencias eliminaba este gen (ver Materiales y Métodos). Los resultados indicaron que la *Df(2R) 58D1-59 A1* y *Df(2R) 58B3-59 A1* (**Figura 24**) delecionan entre otros el gen *dRYBP* (**Figura 25**). Se estudiaron las interacciones de estas deficiencias con el cromosoma *Df(2vg^D)*, *Asx^{xf23}*, *Pc^{IXM3}* que contiene mutaciones en tres genes del grupo PcG (ver Materiales y Métodos). Tanto los individuos *Df(2R) 58D1-59 A1 / Df(2vg^D)*, *Asx^{xf23}*, *Pc^{IXM3}*, como los individuos *Df(2R) 58B3-59 A1 / Df(2vg^D)*, *Asx^{xf23}*, *Pc^{IXM3}*, mostraron una reducción en el tamaño del ala comparado con los individuos *Df(2vg^D)*, *Asx^{xf23}*, *Pc^{IXM3}* / +. Esto podría ser interpretado como la existencia de un factor en la *Df(2R) 58D1-59 A1* que incrementa la transformación de ala en halterio debido al efecto haplo-insuficiente de las mutaciones en el grupo PcG de las moscas la *Df(2vg^D)*, *Asx^{xf23}*, *Pc^{IXM3}* / +.

Por último, se estudió la expresión de la β-galactosidasa dirigida por la construcción

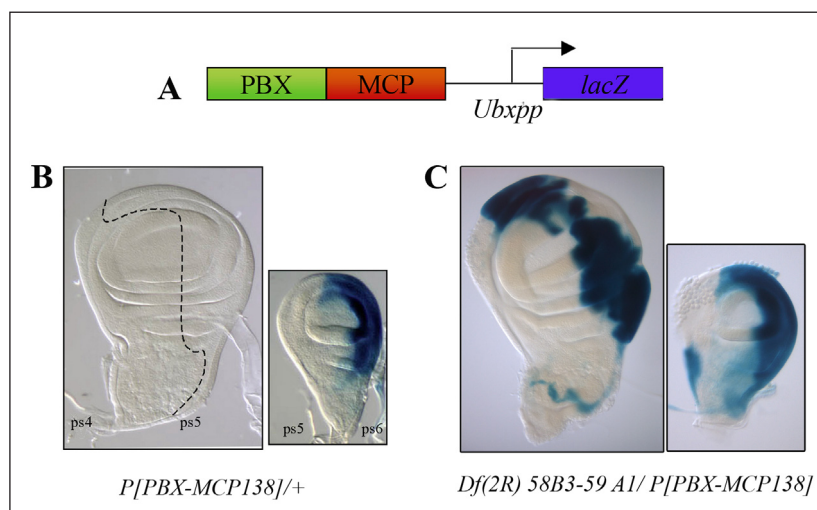


Figura 26.
Expresión de *P[PBX-MCP]UbxplacZ* en discos imaginales *Df(2R) 58B3-59 A1/+*.
(A) Esquema de la construcción *P[PBX-MCP]UbxplacZ*.
(B) Expresión del *lacZ* en discos imaginales de ala y halterio de larvas conteniendo la construcción *P[PBX-MCP]UbxplacZ*. La expresión está reprimida anterior al ps6.
(C) Discos imaginales de ala y halterio de larvas de la *Df(2R) 58B3-59 A1 / P[PBX-MCP]UbxplacZ*, la expresión de *lacZ* se des-reprime en los compartimentos anteriores. Las líneas punteadas indican el límite entre PS4 y PS5 en el disco de ala y entre PS5 y PS6 en el halterio.

P[PBX-MCP138] (ver Materiales y Métodos) en los discos imaginales de larvas *Df(2R) 58B3-59 A1/ P[PBX-MCP138]* y de larvas *Df(2R) 58D1-59 A1/ P[PBX-MCP138]*. En ambos casos se observó des-represión de la expresión del *lac-Z*, indicando que existía una actividad represora en alguno/s de los genes descubiertos por ambas deficiencias (**Figura 26**).

1. OBTENCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN *dRYBP* MEDIANTE LA ESCISIÓN DE ELEMENTO *P[KG08683]*.

Durante la realización de éste trabajo, se describió en la literatura la existencia del elemento *P[KG08683]* ó *P{SUPor-P}CG12190^{KG08683}* (Bellen y cols., 2004), insertado en el gen *dRYBP*. Ya que, como se verá mas adelante, la inserción de éste elemento P en el gen *dRYBP* produce una mutación en el mismo, la hemos denominado *dRYBP^{P[KG08683]}*. Mediante PCR inversa se comprobó molecularmente su localización genómica, resultando estar insertado en el exón 5'UTR del gen *dRYBP* (**Figura 28**). Las moscas *dRYBP^{P[KG08683]}/CyO* no muestran ningún fenotipo similar a mutaciones del tipo PcG o trxG. Sin embargo éstas moscas si presentan otro tipo de fenotipos (**Figura 30**) como se describirá más adelante. Las moscas *dRYBP^{P[KG08683]}/dRYBP^{P[KG08683]}* son en su mayoría letales, aunque en el stock *dRYBP^{P[KG08683]}/CyO* aparecen, con baja frecuencia, individuos homocigóticos, cuyo fenotipo detallado se describe más adelante. Para analizar la función del gen *dRYBP* se generaron mutantes mediante el método de escisión imprecisa del elemento P [*KG08683*] (Spradling y Rubin, 1982) (ver Materiales y Métodos). Ya que las moscas *dRYBP^{P[KG08683]}/dRYBP^{P[KG08683]}* son en su mayoría letales homocigóticas,

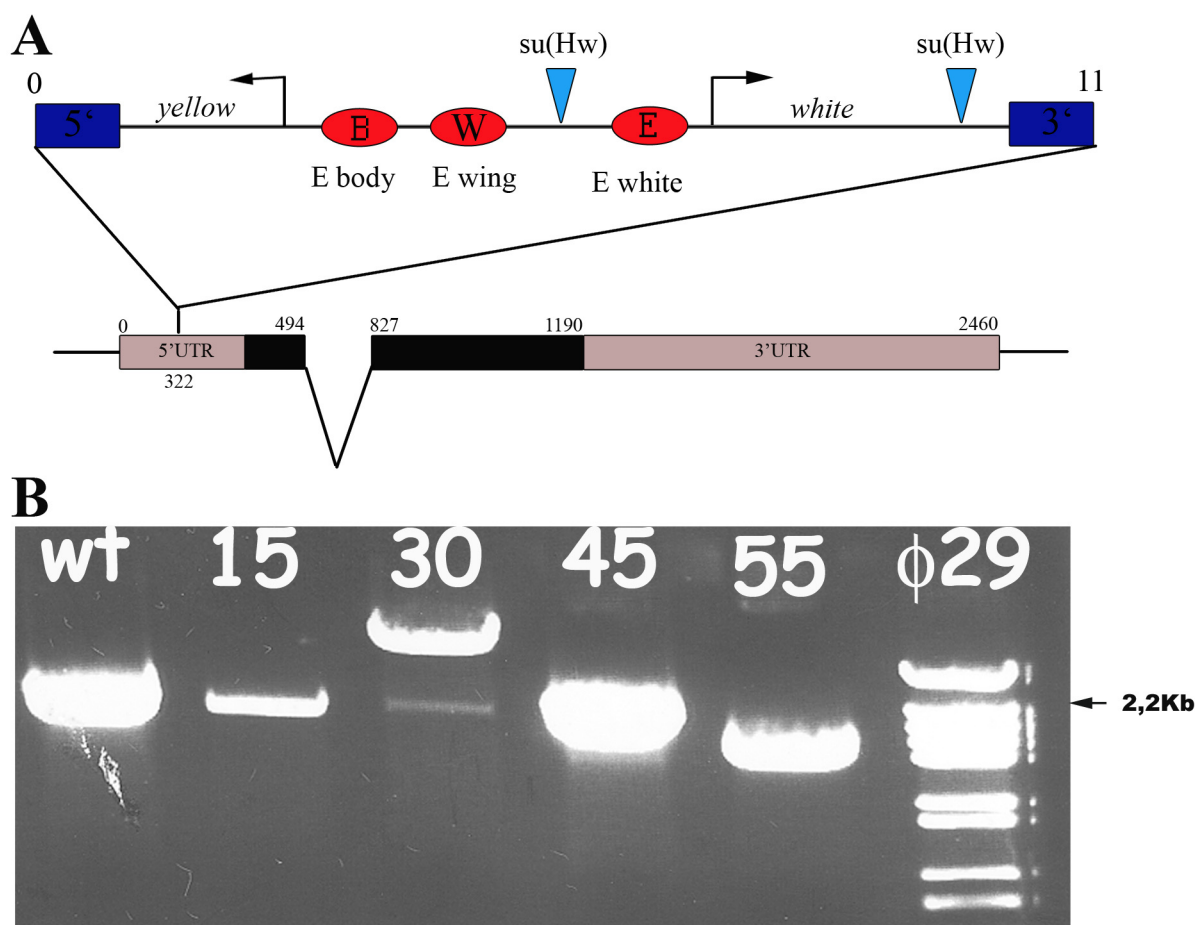


Figura 27. Esquema del elemento P [KG08683]. (A) Composición y localización del elemento P [KG08683] insertado en el exón 5'UTR del gen *dRYBP*. (B) Foto de un gel de agarosa, mostrando los tamaños de los productos de PCR de ADN genómico de moscas silvestres (wt) y de moscas revertientes (15, 30, 45 y 55). El ADN se amplificó con los oligonucleótidos RYBP_{5'} y RYBP_{3'} (Tabla 3 materiales y métodos) y Φ29 indica el marcador de tamaño molecular.

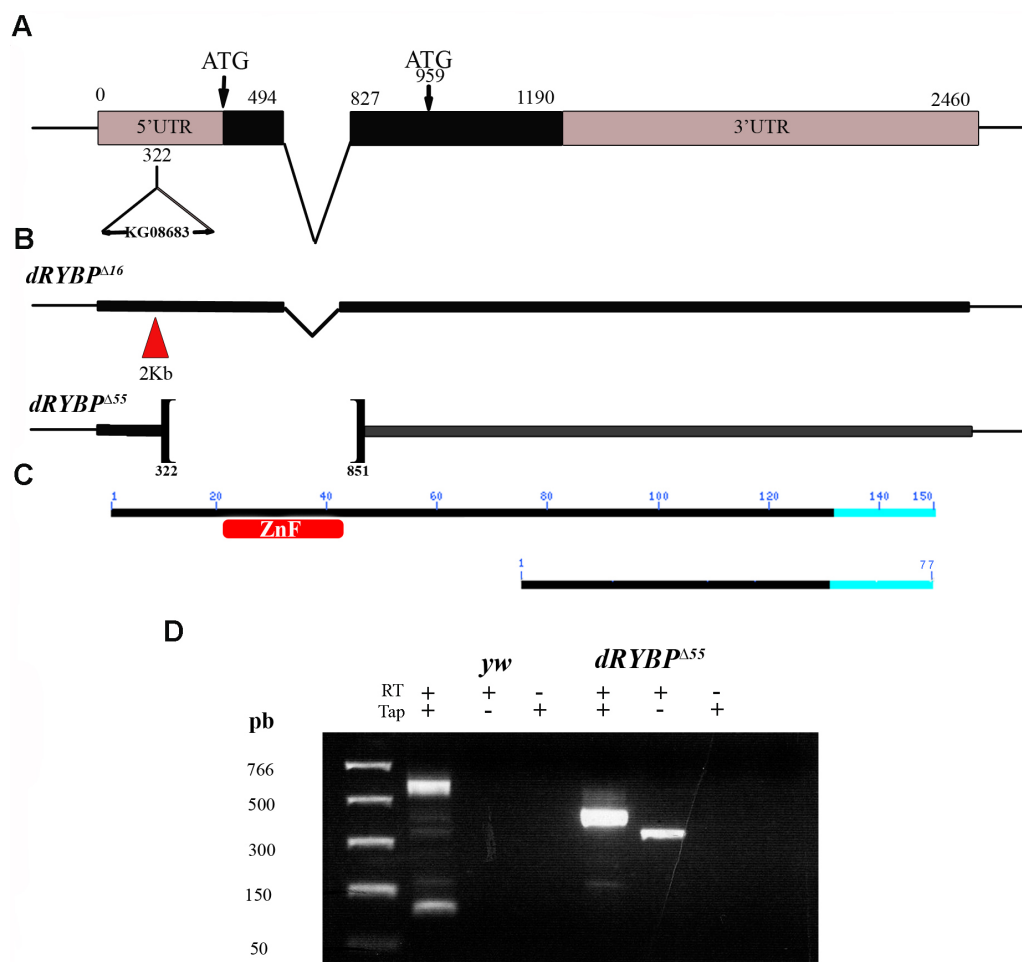


Figura 28. Mapa molecular de *dRYBP*^{Δ16} y *dRYBP*^{Δ55}. (A) Esquema del gen *dRYBP*, las flechas indican los dos ATGs existentes. (B) Esquema de las mutaciones *dRYBP*^{Δ16} y *dRYBP*^{Δ55}. (C) Esquema de la proteína silvestre de *dRYBP* y de la hipotética proteína que se formaría a partir del segundo ATG. (D) Foto de un gel de agarosa, mostrando los tamaños del RACE usando los oligonucleótidos 5' RACE Adapter y RYBP RT₃ (Tabla 3 materiales y métodos). Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles 2, 3 y 4: RACE de moscas silvestres, cepa *Df(1)w^{67c23}*. Carriles 4, 5 y 6: RACE de moscas *dRYBP*^{Δ55}. La banda en el carril 5 es inespecífica (Roche). TAP: tobacco acid pyrophosphatase. RT: Reverse transcriptase.

se quiso saber si la letalidad estaba asociada a la inserción del elemento *P* [*KG08683*]. Para ello, se obtuvo una línea isogénica del elemento *P* [*KG08683*] mediante cruces individuales de machos *dRYBP*^{*P* [*KG08683*]/CyO} con hembras *yw; If/CyO*. Esta línea isogénica se utilizó para la obtención de los saltos del elemento *P* [*KG08683*] (ver Materiales y Métodos **Figura 13**). Se obtuvieron 353 saltos independientes (denominados *revertiente* (*yw*)) en la **Figura 13** que se detectaron por la pérdida de los marcadores *yellow* y *white* y se generaron 353 stocks, *yw; P[(w y)/CyO wglacZ]*. Se estudió el fenotipo en homocigosis y en hemizigosis con la *Df(2R) 58B3-59A1*. Ya que en ninguno de los casos se obtuvo un fenotipo morfológico aparente, se analizó molecularmente el 50% de los revertientes mediante PCR, usando los oligos 5' *dRYBP* y 3' *dRYBP* (ver **Tabla 3** Materiales y Métodos) para la amplificación de un fragmento de 2,4kb que abarca todo el gen. Se compararon los tamaños de los productos de PCR obtenidos del genoma de los individuos posibles mutantes con el obtenido al hacer una PCR del genoma de individuos salvajes (**Figura 27**). El análisis molecular y la secuenciación de los 170 saltos indicaron que la gran mayoría fueron escisiones precisas, y sólo dos de ellos dieron lugar a escisiones imprecisas que no contenían mutaciones puntuales en su secuencia y que las denominamos *dRYBP*^{Δ16} y *dRYBP*^{Δ55}.

2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DE LAS MUTACIONES *dRYBP*^{P[KG08683]}, *dRYBP*^{Δ16} Y *dRYBP*^{Δ55}

dRYBP^{P[KG08683]}, la inserción del elemento *P{SUPor-P}CG12190*^{KG08683} (Bellen y cols., 2004)) en el gen *dRYBP* produce una mutación del mismo. El análisis por PCR cuantitativa (ver Materiales y Métodos) indicó que *dRYBP*^{P[KG08683]} representa una falta de función del gen, ya que el ARNm no se expresa ni en embriones ni en larvas *dRYBP*^{P[KG08683]}/*dRYBP*^{P[KG08683]} (**Figura 29**). Además, la tinción con anti-dRYBP mostró que la proteína no se expresa en discos imaginales

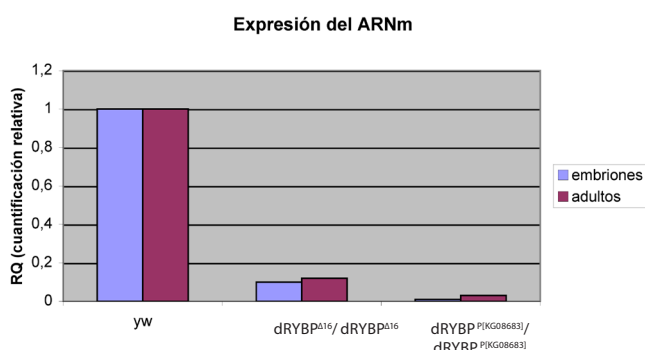


Figura 29. Análisis de los niveles de expresión de ARNm por PCR cuantitativa. En ábsidas se representa la cuantificación relativa de los niveles de ARNm usando como estándar los niveles de ARNm de la ARNpol II y la proteína ribosómica 18S. En ordenadas se representan los diferentes genotipos de las moscas analizadas (azul ARN de embriones y violeta ARN de adultos). Tanto en embriones como en adultos de las mutaciones *dRYBP*^{P[KG08683]}/*dRYBP*^{P[KG08683]} y *dRYBP*^{Δ16}/*dRYBP*^{Δ16} se observa una disminución casi total de los niveles de expresión.

de larvas homocigóticas *dRYBP*^{P[KG08683]}/*dRYBP*^{P[KG08683]}. Sin embargo, si existe expresión de la proteína dRYBP en embriones *dRYBP*^{P[KG08683]}/*dRYBP*^{P[KG08683]}, probablemente debido a su aporte materno. La inserción *P{SUPor-P}CG12190*^{KG08683} no afecta a la expresión de los genes que flanquean el gen *dRYBP* ya que por un lado se estudió la expresión por PCR cuantitativa del gen CG13516, localizado *upstream* del gen *dRYBP* y se observó que en embriones *dRYBP*^{P[KG08683]}/*dRYBP*^{P[KG08683]} los niveles de expresión del CG13516 eran normales (datos no mostrados). Por otro lado se realizó un análisis de

complementación con mutaciones en el gen *partner of paired* (*ppa*) (Raj y cols., 2000) localizado *downstream* de *dRYBP*. Las moscas *dRYBP*^{P[KG08683]}/*ppa*^{EP2354} y las moscas *dRYBP*^{P[KG08683]}/*ppa*^{EP698} eran viables y morfológicamente normales.

Las moscas *dRYBP*^{P[KG08683]}/*dRYBP*^{P[KG08683]} son en su mayoría letales llegando a adultos sólo un 13%, muriendo un 40% en estadio embrionario y un 47% en los estadios larvario/pupal. Los embriones homocigóticos letales del stock *dRYBP*^{P[KG08683]}/*CyO-GFP* que llegan a formar cutícula larvaria, no presentan defectos morfológicos aparentes. Sin embargo, los embriones homocigóticos tempranos también del stock *dRYBP*^{P[KG08683]}/*CyO-GFP* teñidos con DAPI, con Histona-3 GFP y con anti-dRYBP muestran defectos severos en la progresión de la mitosis como son 1) la a-sincronización de las divisiones nucleares, 2) el aumento significativo del mecanismo de "fallout o desprendimiento" (Sullivan et al 1993) por el cual los núcleos de la superficie cortical defectuosos y núcleos retrasados en el ciclo, se internalizan al interior del embrión para evitar que lleguen a formar parte de los núcleos somáticos y 3) la aparición de núcleos de gran tamaño y de forma irregular que, probablemente, sean un conjunto de núcleos que no han llegado a dividirse (**Figura 31** y **vídeo** adjunto en el DVD). Las larvas homocigóticas tardan 10 días en llegar a la fase pupal (frente a los 4 días en condiciones normales) y aquellas que se mueren en los estadios larvarios no presentan ningún defecto cuticular aparente. Sin embargo, sus discos imaginales son muy pequeños, las traqueas estas malformadas y aparecen unos cuerpos necróticos o melanóticos (Minakhina y Steward, 2006) que fundamentalmente afectan al sistema digestivo y a las glándulas salivales (**Figura 30**), hasta que llegado un momento mueren. Los individuos adultos *dRYBP*^{P[KG08683]}/*dRYBP*^{P[KG08683]} muestran fenotipos con muy poca expresividad, a veces poco penetrantes, como las alas mas pequeñas y en forma de paraguas, la reducción de la longitud de la vena IV, la

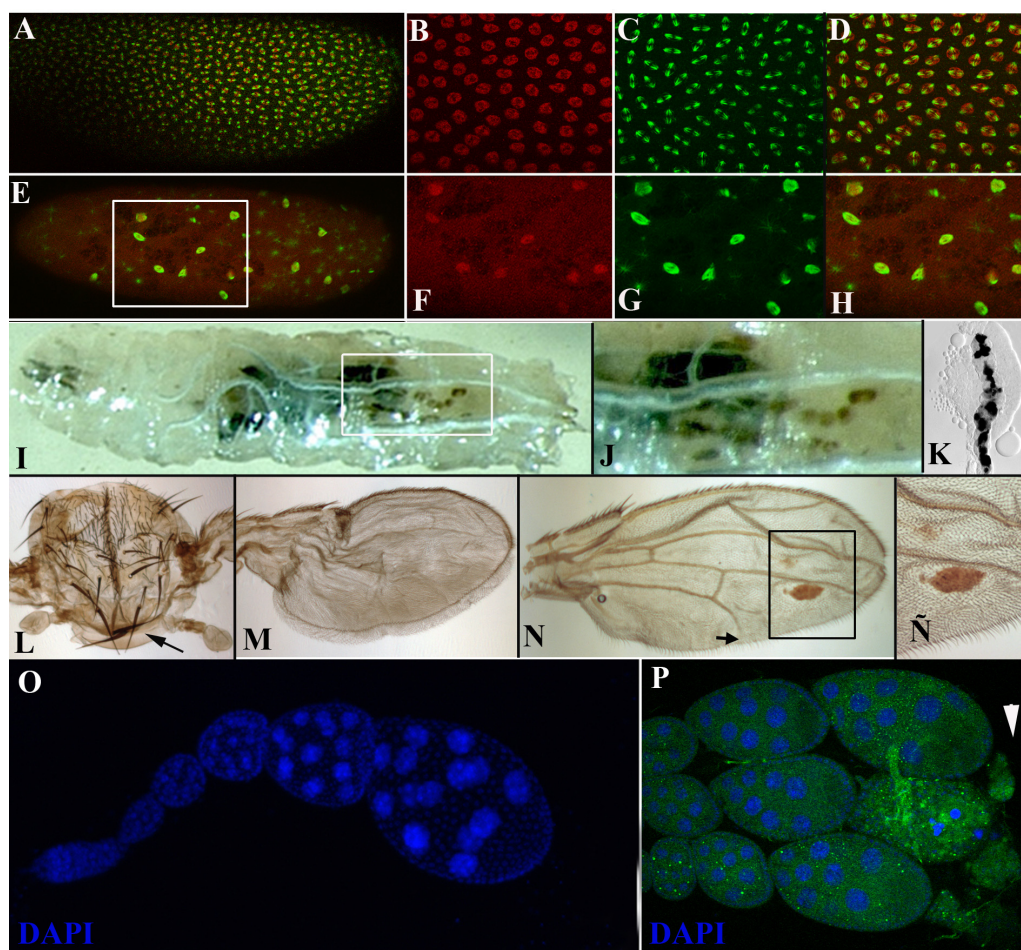


Figura 30. Fenotipos de los individuos $dRYBP^{P[KG08683]}/dRYBP^{P[KG08683]}$. (A, B, C, D) Expresión de $dRYBP$ (rojo) y β -tubulina (verde) en el estadio sincitial de embriones silvestres. $dRYBP^{P[KG08683]}/dRYBP^{P[KG08683]}$. (E, F, G, H) Expresión de $dRYBP$ (rojo) y β -tubulina (verde) en el estadio sincitial de embriones $dRYBP^{P[KG08683]}/dRYBP^{P[KG08683]}$. Las divisiones nucleares son defectuosas y desorganizadas (comparar con el panel superior). (I) Larva mostrando defectos en el sistema traqueal, las pigmentaciones melanóticas en el intestino y en el corazón. (J) detalle de la larva. (K) melanizaciones en las glándulas salivales. (L) Torax mostrando la orientación inversa de las cerdas escutelares. (M) Ala mostrando las ampollas y la falta de venas. (N) Ala mostrando la vena V acortada (flecha) y melanización. (Ñ) Detalle de la melanización del ala. (O) Ovariola silvestre. (P) Ovariola con defectos de desarrollo, se observa una degeneración en estadio 9-10.

aparición de 2 a 3 pelos en el esternito sexto de los machos y malformaciones en las patas, fundamentalmente la pata meta-torácica. Por último, la fertilidad de los individuos homocigóticos está afectada, siendo estériles el 90% de las hembras y el 50% de los machos. Los ovarios de estas moscas presentan problemas de desarrollo, llegando muchas veces a degenerar en estadio 8 del desarrollo (**Figura 30**).

$dRYBP^{\Delta 16}$ es molecularmente una escisión incompleta del elemento $P[KG08683]$, quedando 2Kb correspondientes a la zona 3' del elemento $P[KG08683]$ (**Figura 28**). La secuenciación del ADN genómico de moscas $dRYBP^{\Delta 16}$ homocigóticas, mostró que el gen $dRYBP$ está intacto tanto a un lado como a otro de la inserción. Las moscas $dRYBP^{\Delta 16}/dRYBP^{\Delta 16}$ presentan fenotipo de alas más pequeñas que las normales y de quetas escutelares desorientadas (**Figura 31 L y M**). Este fenotipo también se observa a veces en individuos $dRYBP^{P[KG08683]}/dRYBP^{P[KG08683]}$. Las hembras $dRYBP^{\Delta 16}/dRYBP^{\Delta 16}$ son estériles en alto porcentaje y la esterilidad de los machos no ha sido estudiada. Además, las moscas $dRYBP^{\Delta 16}/dRYBP^{\Delta 16}$ presentan letalidad variable en las distintos estadios de desarrollo. El estudio de la letalidad indicó que un 38% llega adulto, muriendo 33% en fase embrionaria y un 37% en larva/pupa. Los embriones $dRYBP^{\Delta 16}/dRYBP^{\Delta 16}$ letales, que llegan a formar cutícula, no presentan ningún fenotipo morfológico detectable.

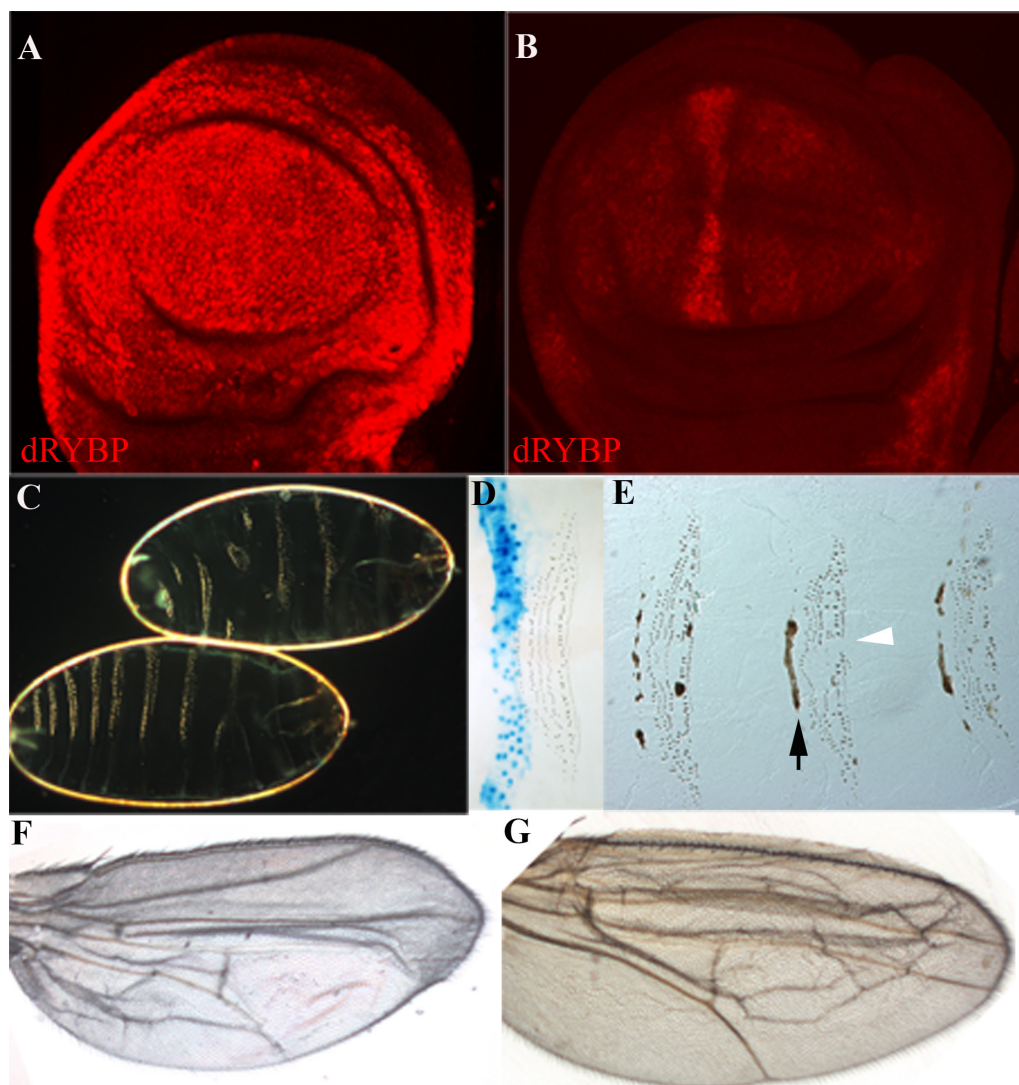


Figura 31. Efectos de la inactivación del gen dRYBP mediante ARN interferente. (A) Expresión de dRYBP (rojo) en disco de ala *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/+*. (B) Expresión de dRYBP (rojo) en disco de ala *sdGAL4/+; UAS-RNAi_{dRYBP}^{T2}*. (C) Larva *enGAL4/UAS-RNAi_{dRYBP}^{T2}; UAS-RNAi_{dRYBP}^{T4/+}*, mostrando desorganización en el patrón de los denticulos ventrales (flecha). (D) Expresión de *en-lacZ* en la cutícula de una larva salvaje de tercer estadio. (E) Cutícula larvaria de *enGAL4/UAS-RNAi_{dRYBP}^{T2}; UAS-RNAi_{dRYBP}^{T4/+}*, mostrando la aparición de melanizaciones (flecha) y la desorganización de los denticulos ventrales (cabeza de flecha). (F) Ala *enGAL4/UAS-RNAi_{dRYBP}^{T2}; UAS-RNAi_{dRYBP}^{T4/+}*, mostrando "ampollas" en el compartimento posterior debido a la falta de aposición de las superficies ventral y dorsal. (G) Ala *ci-gal4/UAS-RNAi_{dRYBP}^{T2}; UAS-RNAi_{dRYBP}^{T4/+}*, mostrando "ampollas" en el compartimento anterior.

Las larvas *dRYBP^{Δ16}/dRYBP^{Δ16}* que se mueren presentan un fenotipo que no es totalmente penetrante, mostrando discos imaginales pequeños, las glándulas salivales y en ocasiones en el intestino presentan manchas melanóticas, similares a las de *dRYBP^{P[KG08683]/dRYBP^{P[KG08683]}}* (Figura 30). Además en muchos casos el árbol traqueal está interrumpido. Mediante PCR cuantitativa (Figura 29) se observó que la expresión del ARNm está muy disminuida respecto a los individuos normales tanto en embriones como en adultos *dRYBP^{Δ16}/dRYBP^{Δ16}*. Por ultimo, se estudió la expresión de la proteína dRYBP, utilizando el anticuerpo anti-dRYBP, en los discos imaginales de larvas homocigóticas *dRYBP^{Δ16}/dRYBP^{Δ16}*, resultando estar ausente en los mismos.

dRYBP^{Δ55} molecularmente es una escisión completa del elemento *P[KG08683]*, que además ha deletado 400pb del gen *dRYBP* eliminando el primer exón, y por tanto eliminando el Zn Finger de la proteína dRYBP (Figura 28). Las moscas *dRYBP^{Δ55}/dRYBP^{Δ55}* son fértiles y via-

bles y no tienen ningún fenotipo aparente, sugiriendo que el dominio proteico Zn finger es dispensable para la función normal de la proteína. Con el fin de descartar la producción de una proteína híbrida, se realizó un RACE de embriones homocigóticos *dRYBP^{Δ55}/dRYBP^{Δ55}* (ver Materiales y Métodos), observándose la existencia de un sólo ARNm de menor tamaño que el de los embriones controles (**Figura 28**). Por último, la expresión de la proteína dRYBP, visualizada mediante tinciones con anticuerpo anti-dRYBP en discos imaginales de larvas *dRYBP^{Δ55}/dRYBP^{Δ55}* (datos no mostrados) es similar a los niveles normales de expresión de larvas salvajes que se muestran en la **Figura 19**.

3. INACTIVACIÓN DE LA FUNCIÓN DE *dRYBP* MEDIANTE ARN INTERFERENTE

Se usó la técnica de ARN interferente (ver Materiales y Métodos) (Giordano y cols., 2002) que se basa en la expresión dirigida de una doble cadena de ARN homóloga al ARN mensajero del gen que se quiere inactivar y por tanto permite interferir directamente sobre el transcrito. La construcción de los vectores apropiados (*UAS-ARNi_{RYBP}*) y la obtención de las moscas transgénicas se realizó como se describe en Materiales y Métodos. La funcionalidad de la construcción *UAS-ARNi_{RYBP}* se demostró mediante el estudio de la expresión de la proteína dRYBP en discos imaginales de larvas *sdGAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-ARNi_{dRYBP} T2* ya que se observó que los niveles de la proteína dRYBP son significativamente menores que en los discos imaginales de larva *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/+* (**Figura 31**). Además, el fenotipo de las alas de las moscas adultas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/+* no se observa en *sdGAL4/+; UAS-dRYBP/UAS-ARNi_{dRYBP} T2* sugiriendo que éste fenotipo se rescata. Estos resultados indican que la inactivación del gen tiene lugar mediante la expresión del ARN interferente.

Para incrementar los efectos de interferencia se realizó el stock *UAS-RNAi_{RYBP} T2; UAS-RNAi_{RYBP} T4*, conteniendo 4 dosis de la construcción *UAS-RNAi_{RYBP}*.

Hembras *UAS-RNAi_{RYBP} T2; UAS-RNAi_{RYBP} T4* se cruzaron con machos *en-GAL4* que se expresa muy temprano en el desarrollo embrionario. Los embriones procedentes de este cruce presentan expresión de la proteína dRYBP, indicando que la inactivación total no tiene lugar. Sin embargo las larvas como los adultos presentan fenotipos, similares a los encontrados en la sobre-expresión del ARN interferente con las líneas *Nub-GAL4*, *da-GAL4* y *ci-GAL4*. Se ha realizado un estudio más detallado con las líneas *en-GAL4* y *da-GAL4* ambas líneas se expresan durante todo el desarrollo. En ambos casos un 50% de los embriones mueren, la mayoría de los embriones mueren antes de secretar cutícula, y los que la secretan muestran defectos de desorganización en los cinturones dentículares (**Figura 31**). Las larvas muestran tejidos necrotizados en el dominio de expresión del GAL4. Los adultos también muestran tejidos necróticos en diferentes partes del cuerpo, además la parte posterior de las alas es un poco más pequeña y presenta problemas de adhesión ventral-dorsal (**Figura 31**). Para la caracterización del fenotipo en el ala se estudió la expresión de UBX en los discos imaginales de ala *en-GAL4/UAS-RNAi_{RYBP} T2; UAS-RNAi_{RYBP} T4/+*, no observándose expresión en los mismos.

De la misma manera, se estudió si la disminución del tamaño era debida al aumento de la apoptosis o a la disminución de la proliferación. Para ello se estudió la expresión de la caspasa-3 y de la P-histona-3 en los discos imaginales de ala *en-GAL4/UAS-RNAi_{RYBP} T2; UAS-RNAi_{RYBP} T4/+* y no se observó ninguna alteración de su expresión.

Estudio del requerimiento funcional del gen *dRYBP* durante el desarrollo

1) GENERACIÓN DE CLONES DE FALTA DE FUNCIÓN DE *dRYBP* EN LA LÍNEA GERMINAL

La expresión de la proteína y del ARNm en embriones muy tempranos, e incluso tan temprano como en el oocito sugería que la proteína dRYBP estaba siendo depositada por la madre e indicaba un requerimiento muy temprano de la misma. Además, los fenotipos

observados en los ovarios de las moscas *dRYBP*^{P[KG08683]}/*dRYBP*^{P[KG08683]} también sugerían una función temprana. Sin embargo, el hecho de que una fracción significativa (40%) de los embriones homocigóticos se murieran indicaba que la contribución materna no era capaz de rescatar dicha letalidad. Para estudiar el fenotipo en ausencia de la contribución materna y de la contribución cigótica, se generaron clones de falta de función de *dRYBP* en la línea germinal usando las mutaciones *dRYBP*^{P[KG0868]} y *dRYBP*^{Δ16} (ver Materiales y Métodos). Las hembras mosaico mutantes *dRYBP*^{P[KG0868]}/*dRYBP*^{P[KG0868]} homocigóticas en la línea germinal se cruzaron individualmente con machos *Df(2R) 58B3-59A1/CyO-GFP* para eliminar el aporte cigótico de los machos, un elevado porcentaje de estas hembras eran estériles. La progenie fue escasa y se observó un ligero aumento de la letalidad en el estadio embrionario, pero individuos mutantes llegaron hasta adulto.

2) REQUERIMIENTO FUNCIONAL DE *dRYBP* DURANTE EL DESARROLLO

2.1) Generación de clones de falta de función de *dRYBP* durante el desarrollo larvario

Para estudiar la función de *dRYBP* durante el desarrollo, se realizaron clones somáticos de falta de función para el gen *dRYBP* en distintos estadios. Los clones se realizaron mediante la

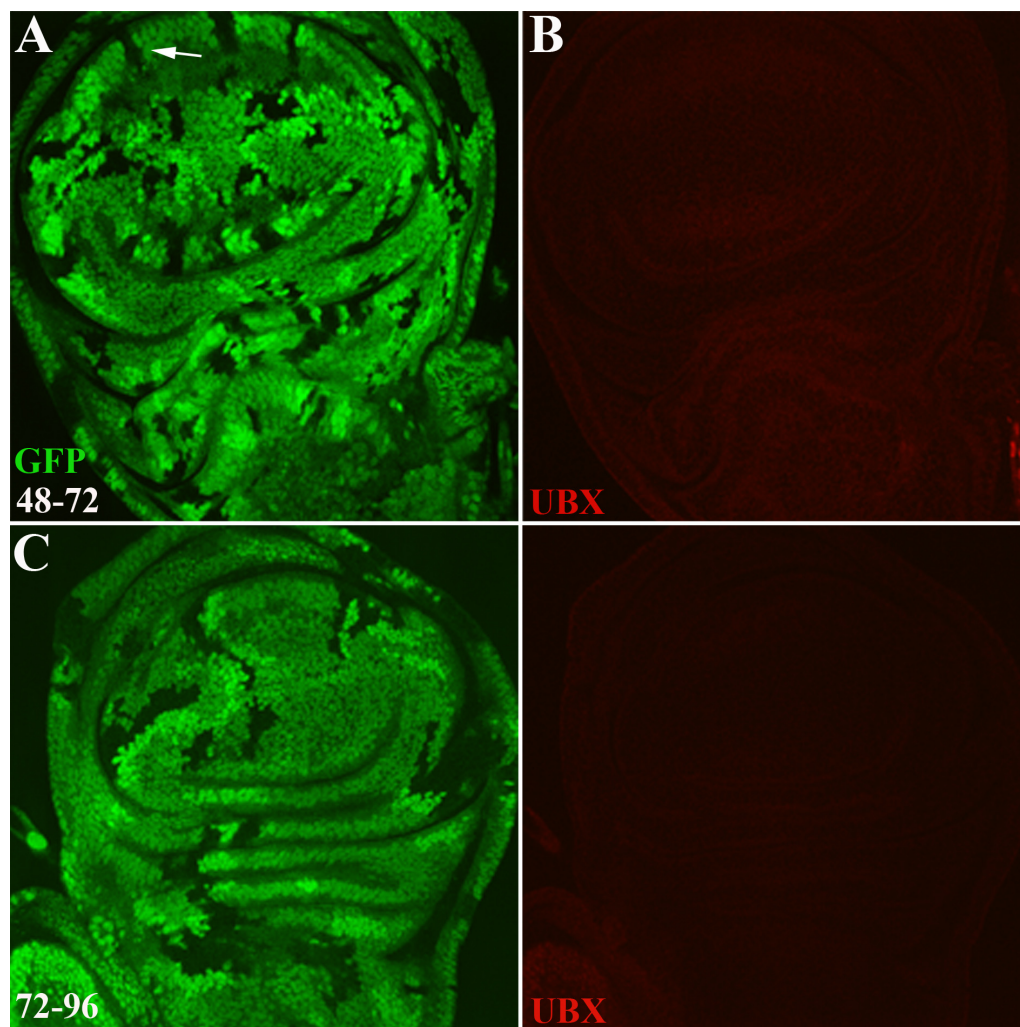


Figura 32. Efecto de la falta de función de *dRYBP* en la expresión de la proteína UB.

(A) Disco de ala de *w¹¹¹⁸; P{FRT(w[hs])}G13 P{Ubi-GFP.nls}2R1 P{Ubi-GFP.nls}2R2/ P{FRT(W^{h3})G13}, *dRYBP*^(KG08683), mostrando la aparición de clones (marcados por la ausencia de expresión de GFP, (flecha) inducidos a 48-72 horas AEL. (B) Discos de ala teñidos con anticuerpo anti-Ubx. No se observa expresión de UB en los clones. (C y D) Lo mismo que A y B pero los clones fueron inducidos a 72-96 horas AEL.*

recombinación inducida con el sistema FRT/FLP (Xu y Rubin, 1993) tanto en fondo genético silvestre como en un fondo genético Minute con el propósito de generar clones de mayor tamaño que facilitan la observación de los fenotipos (Morata y Ripoll, 1975). La descripción de los stocks utilizados y los cruces realizados para la obtención de los clones esta detallada en Materiales y Métodos. Los clones fueron inducidos durante todo el desarrollo a 0-24, 48-72, 72-96 y 96-120 horas después de la puesta del huevo (AEL- after egg laying). Los resultados obtenidos con o sin la técnica Minute fueron muy similares. Se observó que el tamaño de los clones mutantes y el de sus respectivos “twins” fue similar indicando que la ausencia de dRYBP en los clones no induce falta de proliferación. **(Figura 32).**

También se analizó si la expresión de la proteína homeótica UBX se veía afectada en los clones de falta de función de dRYBP en los discos imaginales de ala y halterio. En ningún caso se observó alteración de la expresión de UBX **(Figura 32)**, indicando que no se requiere dRYBP para el mantenimiento de la expresión de UBX.

2.2) Generación de clones de sobre-expresión del *UAS-RNAi_{RYBP}* durante el desarrollo larvario

Se generaron clones de sobre-expresión de ARNi en la progenie del cruce de hembras *UAS-RNAi_{RYBP}^{T2}; UAS-RNAi_{RYBP}^{T4}*, con machos *yw P[hsp70-FLP122]; act-FRT y⁺ FRT GAL4 UAS-GFP/SM5* (Ito y cols., 1997). Los clones se indujeron durante todo el desarrollo a 0-24, 48-72, 72-96 y 96-120 horas de desarrollo después de la puesta del huevo (AEL- after egg laying) mediante un choque de calor a 37°C durante 15 minutos. Los individuos adultos resultantes mostraron defectos de adhesión en las alas y aparición de tejidos necróticos en el cuerpo y las alas similares a los presentados en la Figura 31.

Los resultados obtenidos fueron defectos de adhesión en las alas, y tejidos necróticos. Se observan los mismos fenotipos independientemente del momento en el que se induzca el clón, lo cual indica que dRYBP se requiere durante todo el desarrollo en los mecanismos que generan estos fenotipos.

Estudio de las interacciones genéticas de *dRYBP* con genes *PcG* y *trxG*

El estudio de la expresión de la proteínas homeóticas UBX, ABD-A y ABD-B en embriones homocigóticos *dRYBP^{P[KG08683]} / dRYBP^{P[KG08683]}* indicó que la falta de función de *dRYBP* no alteraba la expresión de las mismos (datos no mostrados). Decidimos estudiar si esto se producía en combinaciones dobles mutantes de *dRYBP* y de genes *PcG* y *trxG*. Se eligieron, del grupo *trxG*, mutaciones en los genes *Trithorax-like* (*Trl⁸⁵*), *Rpd3¹* (Histona-Acetilasa) y *trithorax* (*trx^{E2}*), del grupo *PcG*, mutaciones en los genes *Polycomb* (*Pc³*) y *Sex comb extra* (*Sce¹*). Se estudió la frecuencia de aparición de los fenotipos de pigmentación/despigmentación en el abdomen, de aparición/desaparición de peines sexuales, de transformaciones de antena en pata y de transformaciones de ala en halterio y viceversa. Como se observa en la **Figura 33** y en la **Ta-**

Tabla5. Porcentaje de machos con el fenotipo indicado. Se miraron 100 machos .

	+/+; +/+	<i>dRYBP^{P[KG08683]} / +;Sce¹ /+</i>	<i>dRYBP^{P[KG08683]} / dRYBP^{P[KG08683]};Sce¹ /+</i>	<i>dRYBP^{P[KG08683]} / +; trx^{E2} /+</i>	<i>dRYBP^{P[KG08683]} / dRYBP^{P[KG08683]}; trx^{E2} /+</i>
Peines sexuales en pata 2 y 3 (%)	0	42	86	-	-
Despigmentación del segmento A5 (%)	0	0	68	52	95

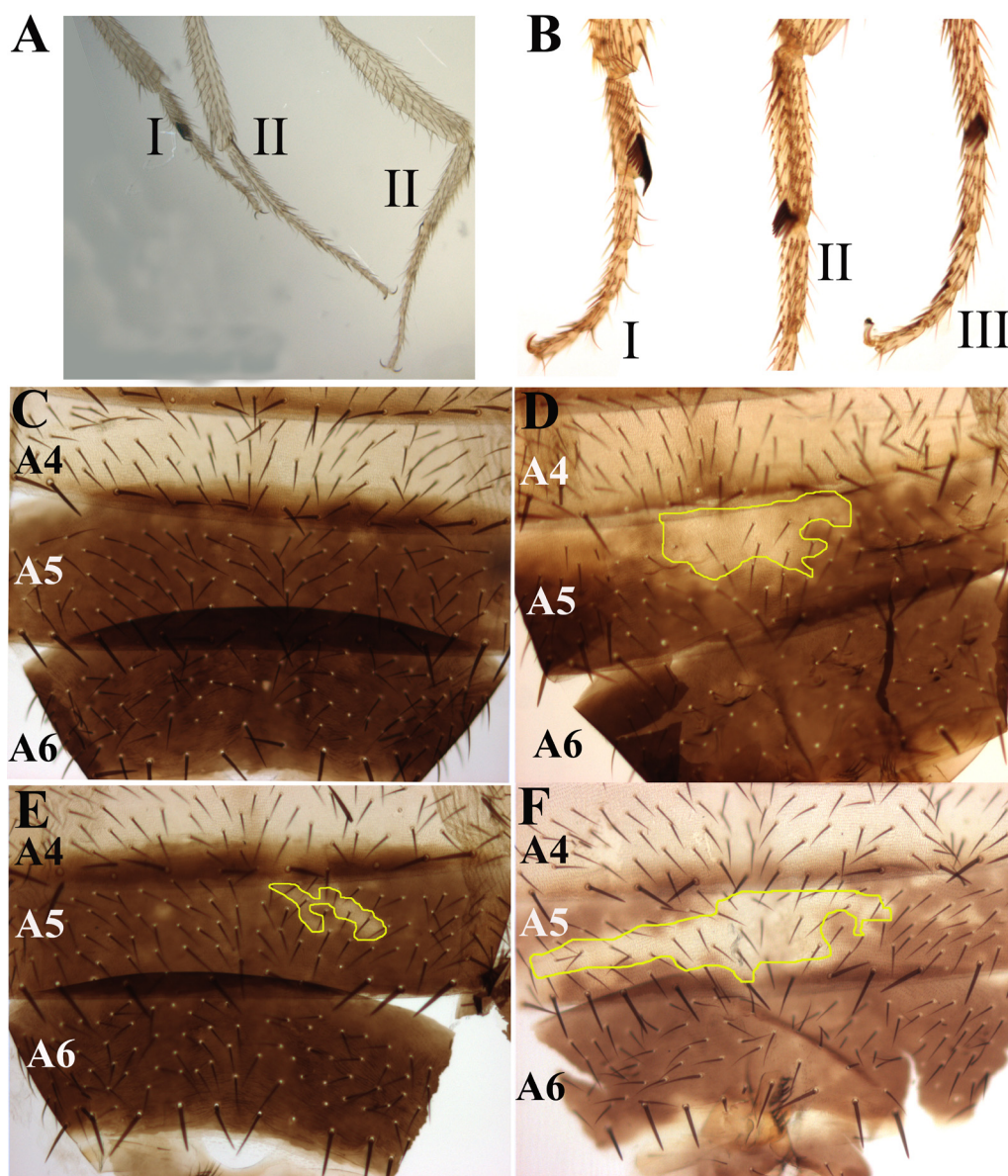


Figura 33. Fenotipos de las interacciones génicas de dRYBP. (A) Patas silvestre de un macho mostrando un peine sexual en la pata I. (B) Patas de machos *dRYBP^{P[KG08683]}/dRYBP^{P[KG08683]}; Sce¹/MKRS*, muestra peines sexuales ectópicos en pata II y III. (C) Abdomen de macho *dRYBP^{P[KG08683]}/CyO; Sce¹/MKRS*. (D) Abdomen de macho *dRYBP^{P[KG08683]}/dRYBP^{P[KG08683]}; Sce¹/MKRS*, muestra grandes parches de despigmentación en el A5. (E) Abdomen de macho *dRYBP^{P[KG08683]}/CyO; trx^{E2}/MKRS*. (F) Abdomen de macho *dRYBP^{P[KG08683]}/dRYBP^{P[KG08683]}; trx^{E2}/MKRS*, muestra aumento del tamaño del parche de despigmentación en el A5

bla 4 las interacciones más evidentes fueron con mutaciones en el gen *trithorax* y en el gen *Sex comb extra*. Estos resultados indican que el gen dRYBP interactúa genéticamente con genes de los grupos PcG y trxB.

Estudio de las interacciones moleculares de la proteína dRYBP con proteínas del grupo PcG

Los resultados de las interacciones génicas anteriores, además de que la represión transcripcional mediada por la proteína dRYBP fuera dependiente de las proteínas PcG y trxB (ver mas adelante **Figura 36**), y resultados de otros laboratorios que indicaban que la proteína RYBP de ratón interactúa con proteínas PcG en ensayos de doble híbrido (Garcia y cols., 1999) (Oyama y cols., 2006) nos sugirieron estudiar las interacciones a nivel molecular de la

proteína dRYBP con otras proteínas PcG (García y cols., 1999). Para ello se realizaron ensayos de inmunoprecipitación y ensayos de “pull-down” (ver Materiales y Métodos) cuyos resultados se muestran en la **Figura 34**. La proteína dRYBP se sobre-expresó mediante el uso de la línea *arm-GAL4*, que dirige la expresión ubicuamente y desde muy temprano en el desarrollo embrionario. Los extractos proteicos de embriones *arm-GAL4; UAS-dRYBP* se inmunoprecipitaron con los anticuerpos anti-SCE (Gorfinkiel y cols., 2004), anti-PHO (Brown y cols., 2003) y anti-PC (Wang y cols., 2004) Como se observa en la **Figura 34**, nuestros resultados indican que la proteína dRYBP interacciona molecularmente con SCE. Los experimentos de inmunoprecipitación con anti-PC y anti-PHO, aunque se repitieron en muy diferentes condiciones, nunca llegaron a ser concluyentes, por lo que se realizaron ensayos de “pull down” con anti-PC y anti-PHO. De estos resultados, se pudo concluir (**Figura 34**) que dRYBP interacciona con PHO, siendo otra vez no concluyentes los experimentos de “pull down” con anti-PC.

Por tanto estos resultados indican que dRYBP es capaz de interactuar físicamente con al menos las proteínas PHO y SCE, ambas del grupo PcG.

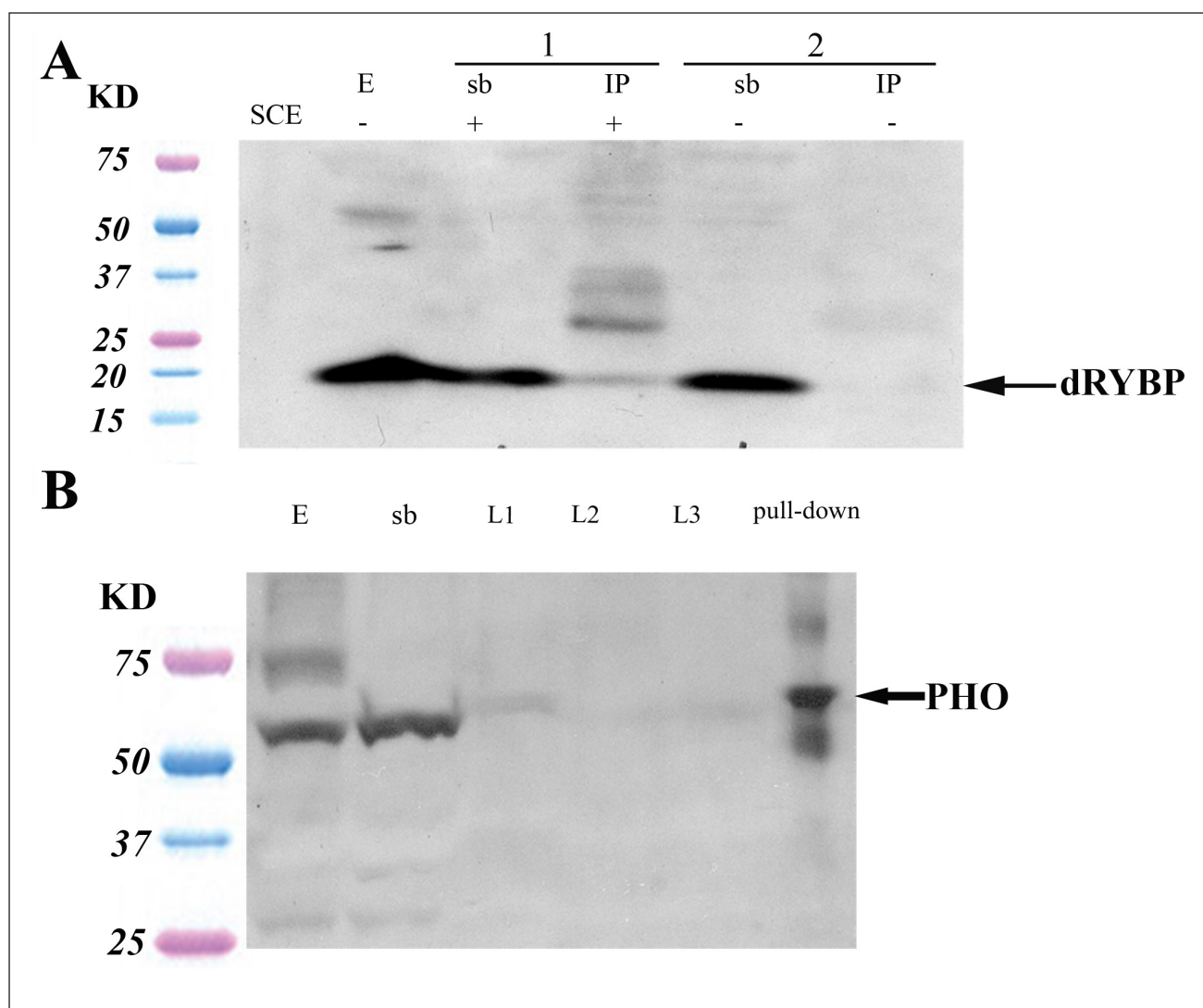


Figura 34. Interacciones moleculares de dRYBP. (A) Co-Inmunoprecipitación de dRYBP con SCE. Las proteínas de un extracto de embriones *arm-Gal4/UAS-dRYBP* (0-18 horas de desarrollo) se inmunoprecipitaron con anti-SCE (1) y con suero pre-inmune (2) y se sometieron a un western blotting con anti-dRYBP. (E) extracto proteico de embriones *arm-Gal4/UAS-dRYBP* (2), (sb) sobrenadante, (IP) inmunoprecipitación. (B) Ensayo de pull down. Se purificó proteína dRYBP en condiciones nativas y se realizó un ensayo de pull-down para ver la interacción de dRYBP con PHO. (E) extracto proteico, (L) lavados.

La proteína *dRYBP* se comporta como un represor transcripcional cuando se une a ADN

Nuestros resultados indicaban que *dRYBP* interactuaba con las proteínas PcG y con las proteínas *trxG*. Ya que estos dos grupos de proteínas tienen actividades transcripcionales opuestas (represora vs activadora) se decidió estudiar que tipo de actividad transcripcional estaba ligada a *dRYBP*. La proteína *dRYBP*, como la mayoría de las proteínas PcG, no se une directamente a ADN, por lo que se generaron dos minigenes de fusión (*hs-GALDB-dRYBP* y α -*tubulina-GALDB-dRYBP*) ambos conteniendo la secuencia completa del ADNc de *dRYBP* fusionada al dominio de unión a ADN del factor de transcripción de levaduras GAL4 (Keegan y cols., 1986) pero con diferentes promotores: a) *hsp70*, inducible por choques térmicos a cualquier estadio del desarrollo y b) α -*tubulina*, ubicuo y constitutivo ya desde estadios muy tempranos del desarrollo embrionario. Curiosamente, se pudieron obtener moscas transgénicas *P[hs-GALDB-dRYBP]* pero no *P[α-tubulina-GALDB-dRYBP]*.

Para estudiar la actividad transcripcional de la proteína híbrida, se utilizaron dos minigenes marcadores denominados abreviadamente BGUZ y BHL4G4PRE (ver Materiales y Métodos). El primero permite visualizar una actividad transcripcional “represora” en el embrión (ver mas adelante) y el segundo permite visualizar además una actividad transcripcional “activadora” en el embrión y en los discos imaginales (ver mas adelante). El minigen BGUZ (Muller, 1995) contiene los sitios específicos UAS, donde se une el dominio GAL4 (UAS), el elemento *cis*- activador BXD del gen *Ubx* que controla la expresión del gen marcador *lacZ* (**Figura 35**). Este minigen dirige la expresión ubicua del *lacZ* en el sistema nervioso central y en la epidermis durante la embriogénesis. Se ha demostrado que esta expresión ubicua se reprime cuando se sobre-expresan las proteínas de fusión GAL4-PC (Muller, 1995) y GAL4-YY1 (el homólogo de PHO en ratón) (Atchison y cols., 2003).

El minigen BHL4G4PRE contiene los sitios específicos de unión al dominio GAL4 (UAS), el enhancer activador embrionario BX y el enhancer activador de discos imaginales 2212H1, que controlan la expresión del *UbxplacZ*. Además, la construcción contiene un PRE que mantiene la expresión del gen marcador restringida desde el PS6 hasta el PS12 tanto en embrión como en larva (**Figura 35**). La expresión de este gen marcador se modifica mediante la sobre-

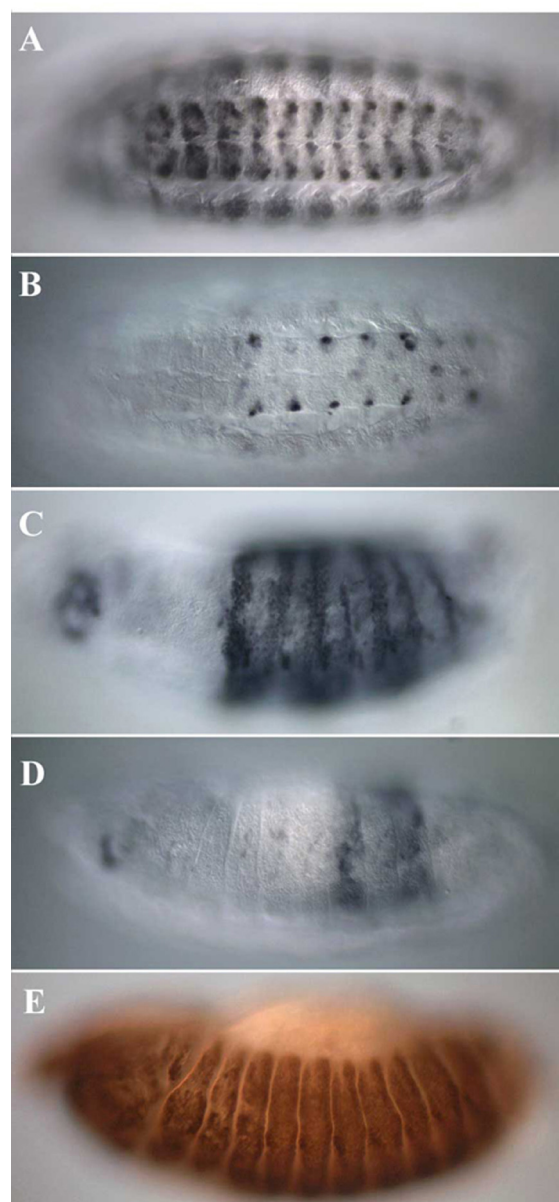
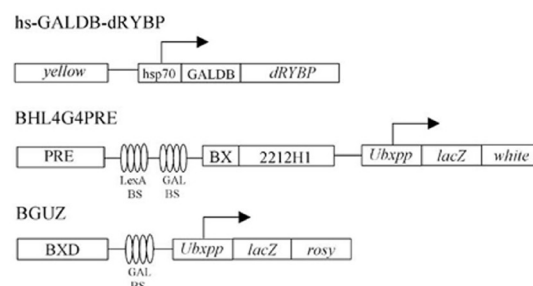


Figura 35. Sobre-expresión de GALDB-dRYBP durante la embriogénesis. En el panel superior se muestra un esquema de las construcciones genéticas utilizadas: *hs-GALDB-dRYBP*, *BHL4G4PRE* y *BGUZ*. En el panel inferior se muestra la expresión del *lacZ* en embriones de los siguientes genotipos: (A) *P[BGUZ]* se observa expresión de *lacZ* en la epidermis y el sistema nervioso central (SNC) a lo largo de todo el eje anterior-posterior del embrión. (B) *P[BGUZ]; P[hsGALDB-dRYBP]* después de un choque térmico, la expresión de *lacZ* está reprimida en la mayoría de las células de la epidermis y de las células del SNC. (C) *P[BHL4G4PRE]*, *lacZ* se expresa desde el PS6 al PS12 de la epidermis. (D) *P[BHL4G4PRE]; P[hsGALDB-dRYBP]* en estadio 14 después de un choque térmico muestran represión de la expresión de *lacZ* en la mayoría de las células. (E) Control *P[hsGALDB-TRX]; P[BHL4G4PRE]* después de un choque térmico muestran expresión ubicua.

expresión de la proteína de fusión TRX-GAL4DB (Poux y cols., 2002) (**Figura 35**).

Para estudiar el comportamiento transcripcional de dRYBP, moscas transgénicas con la construcción *P[hsp70 dRYBP-GAL4DB]* se cruzaron con moscas transgénicas *P[BGUZ]*, la progeñie fue sometida a un heat-shock (ver Materiales y Métodos para la descripción de los detalles del experimento), y se estudió la expresión del gen marcador *lacZ* en los embriones. Los resultados mostraron que la sobre-expresión de la proteína dRYBP-GAL4DB reprime la expresión del gen *lacZ* dirigida por *P[BGUZ]* en la mayoría de las células del embrión. Aunque, no se comprobó la estabilidad de la proteína de fusión, parece que la represión se mantuvo estable hasta estadios tardíos del desarrollo embrionario (**Figura 35**). Estos resultados indican que la proteína dRYBP-GAL4DB se comporta como un represor transcripcional durante la embriogénesis.

Por otro lado, se cruzaron moscas con la construcción *P[hsp70 dRYBP-GAL4D]* con moscas transgénicas *P[BHL4G4PRE]* (ver Materiales y Métodos) y se estudio la expresión de β -gal en los discos imaginales de las larvas progeñie. Como se muestra en la **Figura 36**, la proteína dRYBP-GAL4DB se comporta también como un represor transcripcional durante el desarrollo larvario, ya que se observa represión del gen *lacZ* en los discos imaginales y represión del gen *white*, incluido en la construcción *P[BHL4G4PRE]*, en los ojos de las moscas adultas.

Estos resultados muestran que cuando la proteína dRYBP se une a ADN, es capaz de reprimir la transcripción durante todo el desarrollo.

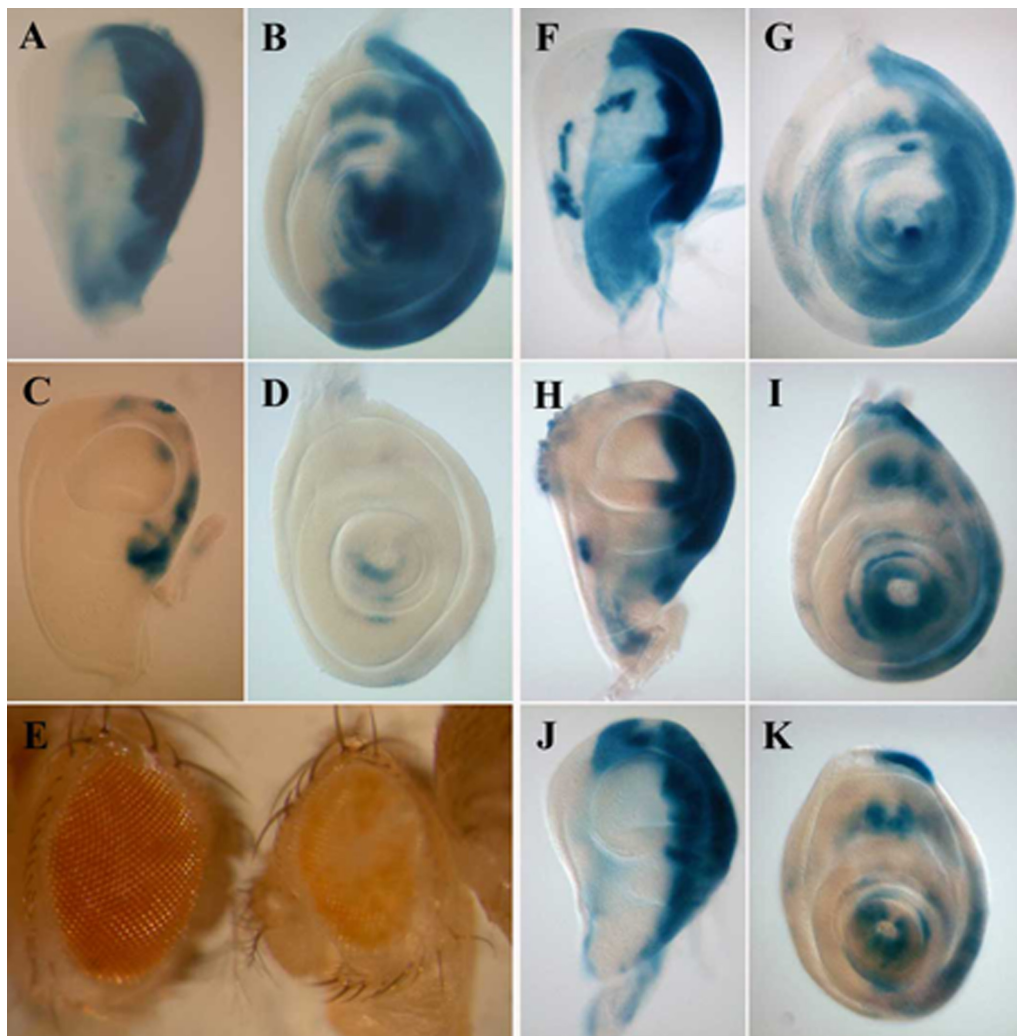


Figura 36.
Sobre-expresión de GALDB-dRYBP durante el desarrollo de los discos imaginales y su dependencia de proteínas PcG.

Panel de la izquierda (A-E) efectos de la sobre-expresión de GAL4DB-dRYBP. Panel de la derecha (F-K) efectos de la sobre-expresión de GAL4 en fondos mutantes para proteínas PcG. (A) Expresión del *lacZ* dirigida por *P[BHL4G4PRE]* en el PS6 del disco de halterio. (B) Expresión del *lacZ* dirigida por *P[BHL4G4PRE]* en el PS6 en el disco de la pata meta-torácica. (C) Expresión del *lacZ* en el disco de halterio de larvas *P[hsGALDB-dRYBP]*; *P[BHL4G4PRE]* sometidas a un choque térmico. (D) Expresión del *lacZ* en el disco de pata meta-torácica de larvas *P[hsGALDB-dRYBP]*; *P[BHL4G4PRE]* sometidas a un choque térmico. En ambos casos (C y D) se observa represión de la expresión del *lacZ*. (E) Cabezas de moscas *P[BHL4G4PRE]*, (izquierda control) y *P[hsGALDB-dRYBP]*; *P[BHL4G4PRE]*, (derecha) mostrando represión de la expresión del gen *white* en el ojo. Expresión del *lacZ* en discos de halterio y pata meta-torácica de larvas de *P[hsGALDB-dRYBP]*; *P[BHL4G4PRE]*; *Pc³/+* (F, G), *P[hsGALDB-dRYBP]*; *P[BHL4G4PRE]*; *Sce¹/+* (H, I) y *P[hsGALDB-dRYBP]*; *P[BHL4G4PRE]*; *pho¹/+*. La represión del *lacZ* debida a la sobre-expresión de dRYBP (C y D) no tiene lugar en fondos mutantes para las proteínas PcG (F-K).

La represión transcripcional mediada por *dRYBP* es dependiente de PcG

Se quiso averiguar si la represión ejercida por *dRYBP-GAL4DB* es dependiente de las proteínas PcG. Se eligieron tres genes PcG: *Pc*, *Sce* y *pho* y se hizo el análisis de la actividad transcripcional en fondo mutante heterocigótico para los tres genes. Se cruzaron moscas *P[hs-GALDB-dRYBP]/P[hs-GALDB-dRYBP]; P[BHL4G4PRE]/P[BHL4G4PRE]* con moscas *Pc³/TM6B*, *Sce¹/TM6B* o *pho¹/ci^D*. Se dio un choque térmico a la progenie y se estudió el patrón de expresión en los discos imaginales. Como se muestra en la **Figura 36**, la represión ejercida por la proteína *dRYBP-GAL4DB* no tiene lugar en ausencia de una copia de cualquiera de los tres genes estudiados. Sin embargo, en algunos casos (**Figura 36 F, G**) se observan zonas con represión del gen marcador en el compartimento posterior y ocasionalmente, se ven parches de expresión del *lacZ* en el compartimento anterior de los discos. Esto bien podría ser debido a la naturaleza heterocigótica (*PcG/+*) de las larvas estudiadas, de modo que con una sola copia de los genes PcG es suficiente para producir esa pequeña represión en el compartimento posterior mientras, que los parches de des-represión en el compartimento anterior son probablemente debidos a los efectos de mutaciones en PcG sobre la expresión intrínseca de *P[BHL4G4PRE]*. Estos resultados muestran que *dRYBP-GAL4DB* requiere interaccionar al menos con las proteínas PC, SCE, y PHO para reprimir la transcripción.

La sobre-expresión de *dRYBP* modifica el silenciamiento mediado por el elemento *MCP138*

El minigen *P[PBXMCP138]* (ver Materiales y Métodos) contiene elementos *cis*-reguladores de los genes homeóticos que están involucrados en el mantenimiento de la represión transcripcional durante el desarrollo. El patrón de expresión de los individuos transgénicos *P[PBXMCP138]* muestra un borde de expresión en el PS6 que se mantiene durante todo el desarrollo (**Figura 37**). Este mantenimiento es dependiente de las proteínas PcG. Se decidió, por tanto, estudiar si la expresión dirigida por *P[PBXMCP138]* estaba afectada por altos niveles de la proteína dRYBP mediante el uso de la técnica GAL4/UAS. Los discos imaginales de halterio *P[PBXMCP138]/UAS-dRYBP; Ubx-GAL4/+* mostraron una pérdida del borde de expresión, con una expresividad variable, pero un 100% de penetrancia (**Figura**

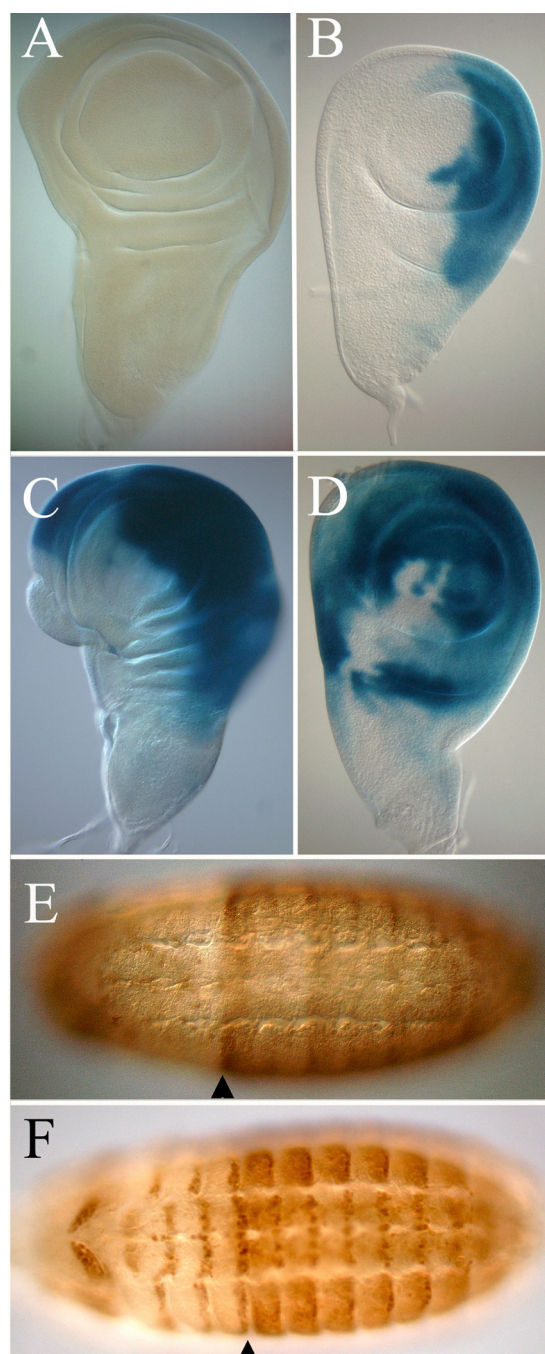


Figura 37. Efectos de la sobre-expresión

de dRYBP en la represión dirigida por el elemento MCP138. (A)

La expresión de *lacZ* esta reprimida en discos de ala de larvas *P[PBXMCP138UbxplacZ]* (B) La expresión de *lacZ* en el disco halterio, en discos de halterio de larvas *P[PBXMCP138UbxplacZ]* se observa solo en el PS6 (C) Expresión del *lacZ* en disco de ala de larvas *P[PBXMCP138UbxplacZ]; UAS-dRYBP/en-GAL4*. (D) Expresión del *lacZ* en disco halterio de larvas *P[PBXMCP138UbxplacZ]; UAS-RYBP/Ubx-GAL4* mostrando expresión anterior al PS6. (E) Expresión del *lacZ* en embriones *P[PBXMCP138UbxplacZ]*, la flecha indica el ps6. (F) Expresión de *lacZ* en embriones *P[PBXMCP138UbxplacZ]; UAS-RYBP/en-GAL4* mostrando des-represión anterior al ps6.

ra 37). Por otro lado, embriones *P[PBXMC138]/UAS-dRYBP; Ubx-GAL4/+* y discos imaginales de larvas *P[PBXMC138]/UAS-dRYBP; Ubx-GAL4/+* mostraron expresión de *lacZ* fuera del dominio de expresión silvestre, con un 100% de penetrancia, y con una expresividad variable (**Figura 37**). Otra línea utilizada fue *engrailed-Gal4* que dirige la expresión en los compartimentos posteriores de cada uno de los segmentos. En este caso se observó una expresión del gen marcador fuera del dominio de expresión silvestre tanto en el embrión como en los discos imaginales larvarios (**Figura 37**).

La sobre-expresión de *dRYBP* genera fenotipos homeóticos

Se obtuvieron moscas transgénicas conteniendo el minigen *UAS-dRYBP* (Materiales y Métodos) para el estudio de los efectos de la sobre-expresión de la proteína *dRYBP*, utilizando el sistema *GAL4/UAS* (Brand y Perrimon, 1993) en distintos momentos del desarrollo y en diferentes partes del cuerpo.

SOBRE-EXPRESIÓN DE *dRYBP* DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS

La sobre-expresión de la proteína se dirigió durante la embriogénesis, mediante el uso de las líneas *armadillo-GAL4* (*arm-GAL4*), *engrailed-GAL4* (*en-GAL4*) y *cubitus-GAL4* (*ci-GAL4*). En ninguno de los casos se observó alteraciones en los patrones de expresión embrionarios de las proteínas homeóticas *UBX*, *ADB-A* y *ADB-B*. Sin embargo, si se observaron fenotipos homeóticos en las moscas adultas resultantes (**Figura 38**).

Las moscas *arm-GAL4/UAS-dRYBP* mostraron fenotipos peines sexuales ectópicos en pata meta-torácica, presencia del fenotipo Ultra-abdominal (*Uab*, transformación del primer segmento abdominal en segmentos posteriores) y fenotipo Micadestral pigmentation (*Mcp*,

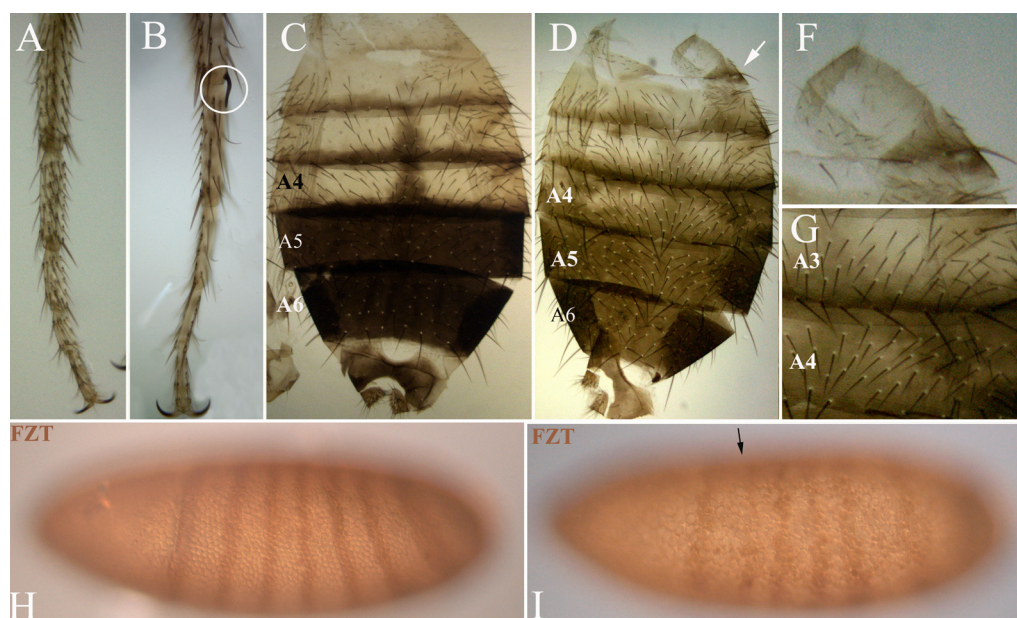


Figura 38. Fenotipos debidos a la sobre-expresión de *dRYBP*. Se muestra los efectos de la sobre-expresión de *dRYBP* en individuos *arm-GAL4/UAS-dRYBP*. **(A)** Pata meta-torácica de macho silvestre. **(B)** Pata meta-torácica mostrando peine sexual (circulo). **(C)** Abdomen de macho silvestre mostrando pigmentación en A5 y A6. **(D)** Abdomen de macho mostrando fenotipo Ultra-abdominal, que consiste en la aparición en el primer segmento abdominal de cerdas correspondientes al Segundo segmento abdominal (flecha) y pigmentación en el cuarto segmento abdominal (cabeza de flecha). **(F)** Detalle del fenotipo Ultra-abdominal. **(G)** Detalle del segmento A4 pigmentado. **(H)** Expresión de la proteína FZT en un embrión silvestre temprano, en siete bandas correspondientes a los parasegmentos impares del embrión. **(I)** Expresión de FZT en un embrión *arm-GAL4/UAS-dRYBP* donde se observa desorganización del patrón en bandas (flecha).

pigmentación ectópica de los segmentos abdominales anteriores al segmento A4 de los machos). Estos fenotipos están relacionados con la des-represión de proteínas homeóticas, sin embargo nuestros datos indican que en los embriones la expresión de las proteínas homeóticas es correcta. Esto puede ser debido a que los fenotipos Uab y Mcp en el adulto abarcan a un número pequeño de células y por tanto es difícil detectar la tinción en embrión o bien porque la des-represión puede ocurrir durante el desarrollo larvario.

Por otro lado, se ha descrito que mutantes en el gen *fushi-tarazu* (*ftz^{pl}*) producen también un fenotipo Ultra-abdominal (Kellerman y cols., 1990) por lo que se examinó la expresión de la proteína FTZ en embriones *arm-GAL4/UAS-dRYBP*, resultando estar alteradas (**Figura 38**). Además, aunque el fenotipo adulto se describirá mas adelante, los embriones *enGAL4/UAS-dRYBP*, también tienen un patrón aberrante de la expresión de la proteína engrailed (datos no mostrados). Estos resultados indican que la sobre-expresión de dRYBP puede producir alteraciones en los patrones de expresión génica durante el desarrollo embrionario.

SOBRE-EXPRESIÓN DE dRYBP EN EL DISCO IMAGINAL DE HALTERIO

Se utilizaron las líneas *Ubx-GAL4* (Calleja y cols., 1996) (**Figura 39**) y *scalloped-GAL4*. Los halterios de las moscas adultas *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP* y *scalloped-GAL4/UAS-dRYBP* muestran un fenotipo que lo hemos denominado “halterio peludo” (**Figura 39**). Estos halterios peludos se caracterizan por tener un tamaño normal, o incluso más pequeño de lo normal, pero sin embargo están recubiertos de tricomas característicos de ala. Esta transformación parcial del halterio en ala, sugería que la expresión de la proteína UBX podría estar afectada ya que, en individuos silvestres, la proteína UBX se expresa en el halterio pero no en el ala (White y Wilcox, 1984). Se analizó la expresión de la proteína UBX en discos de halterio de larvas tanto *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP* como de larvas *sd-GAL4/UAS-dRYBP* y se observó que la expresión de

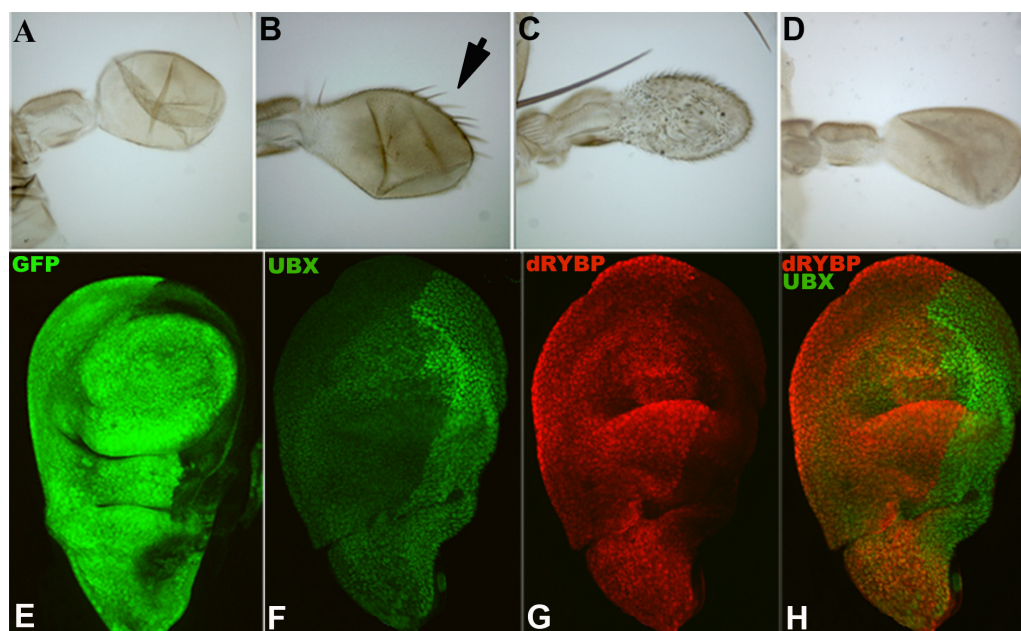


Figura 39. Fenotipos en el halterio debidos a la sobre-expresión de dRYBP en ausencia y presencia de proteínas PcG. Se muestran los efectos fenotípicos en moscas *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP*. (A) Halterio silvestre. (B) Halterio de moscas *Ubx-GAL4/+* presentando fenotipo *Ubx* haplo-insuficiente que consiste en la aparición de cerdas (flecha). (C) Halterio *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP* mostrando el fenotipo de “halterio peludo”. (D) Halterio *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP; Pc3/+* donde se observa el rescate del fenotipo de “halterio peludo”. (E) Disco de halterio de larvas *Ubx-GAL4/+; UAS-GFP* donde se muestra la expresión (en este caso de la proteína GFP) dirigida por la línea *Ubx-GAL4* (F) Expresión de la proteína UBX (verde) en el disco de halterio *UAS-dRYBP/+; Ubx-GAL4/+*. La expresión de UBX se reprime debido a la sobre-expresión de dRYBP. (G) Expresión de dRYBP (rojo) en disco de halterio *UAS-dRYBP/+; Ubx-GAL4*. (H) Superposición de las imágenes del disco de halterio anti-UBX (verde) y anti-dRYBP (rojo).

UBX está reprimida en aquellas células donde dRYBP se está sobre-expresando (**Figura 39**) explicando, por tanto, la transformación parcial hacia ala de los halterios de las moscas (**Figura 39**). Estos resultados indican que la sobre-expresión de dRYBP en el halterio, tiene un efecto represor sobre la expresión de UBX, y curiosamente, el “halterio transformado” aun teniendo características de ala, no crece como un ala.

Se estudió si los fenotipos obtenidos en la sobre-expresión de dRYBP eran modulables por la falta de función de genes PcG y *trxG*. Para ello, se sobre-expresó dRYBP utilizando *Ubx-GAL4* y *sd-GAL4* en moscas conteniendo las mutaciones *Pc³*, *pho¹* y *trx^{E2}*. Individuos *UAS-dRYBP/+; Ubx-GAL4/Pc³* mostraban rescate del fenotipo de “halterio peludo” observado en *UAS-dRYBP/+; Ubx-GAL4/+* (**Figura 39**). Curiosamente, también se observó rescate del fenotipo haplo-insuficiente presentado por la línea *Ubx-GAL4/+*, ya que esta línea es una inserción en el gen *Ubx*. Sin embargo, el fenotipo de “halterio peludo” no se rescató ni en un fondo heterocigótico para *pho¹* ni para *trx^{E2}*.

SOBRE-EXPRESIÓN DE *dRYBP* EN EL DISCO IMAGINAL DE ALA

Se usaron diferentes líneas para dirigir la sobre-expresión de la proteína dRYBP en el disco de ala como *scalloped-GAL4* (*sd-GAL4* líneas 719-GAL4 y 639-GAL4), *nubbin-GAL4* (*nub-GAL4*), *engrailed-GAL4* (*en-GAL4*), *638-GAL4* y *ci-GAL4*. En todos los casos se observaron fenotipos similares. En general, aunque con expresividad y penetrancia variable cuando dRYBP se sobre-expresó en el disco de ala se encontró reducción en el tamaño del ala, interrupción de la triple fila, malformación en el patrón de venas, y tricomas típicos de halterio (**Figura 40**).

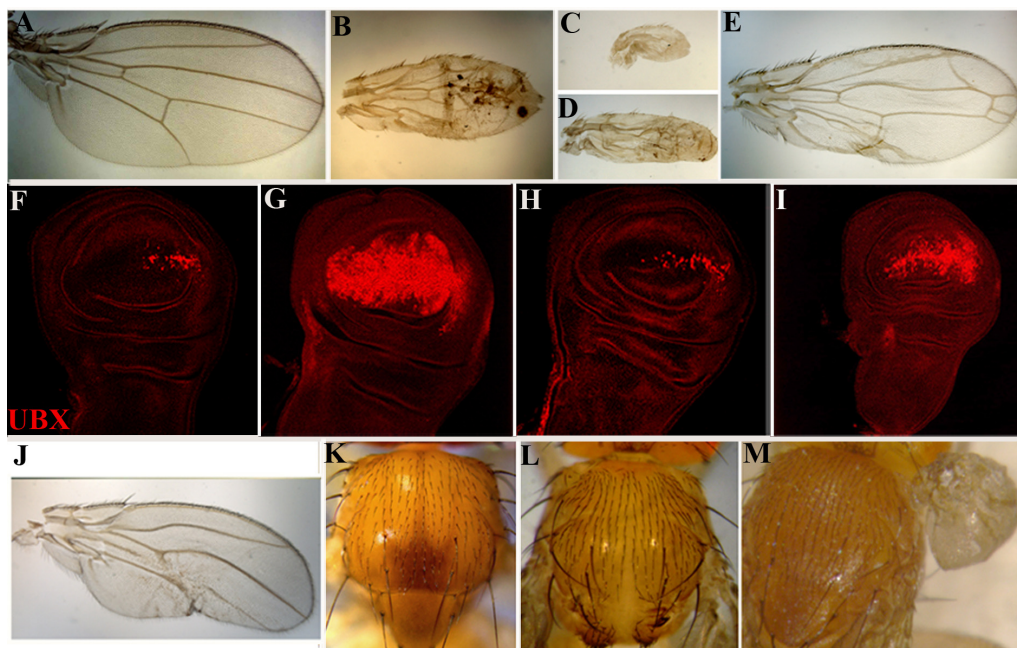


Figura 40. Fenotipos en el ala debidos la sobre-expresión de dRYBP en ausencia y presencia de proteínas PcG y *trxG*. (A) Ala silvestre. (B) Ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP* presentando reducción de tamaño y tricomas característicos de halterio. (C) Ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP; Pc³/+*. La transformación de ala a halterio se incrementa notablemente. (D) Ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP; pho¹/+* mostrando un considerable incremento de la transformación (comparar con B) aunque no tan fuerte como en fondo *Pc³*. (E) Ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP; trx^{E2}/+*, se observa un rescate casi total del fenotipo (comparar con B). (F) Expresión de UBX (rojo) en disco de ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP*. (G) Expresión de UBX en disco de ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP; Pc³/+*, se observa un incremento de la expresión de UBX. (H) Expresión de UBX en disco imaginal de ala *Pc³/+*. (I) Expresión de UBX en disco de ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP; pho¹/+*, produciéndose también un incremento, aunque no tan notable como en G. *en-GAL4/UAS-dRYBP*. (J) Ala *en-GAL4/UAS-dRYBP* mostrando fenotipo de ausencia de vena 4, cerdas de la triple fila y tricomas de halterio en compartimento posterior. (K) Nótum silvestre. (L) Nótum *en-GAL4/UAS-dRYBP* mostrando transformación de meso-nótum posterior a meso-nótum anterior. (M) Nótum *en-GAL4/UAS-dRYBP* mostrando aparición de tejido de ala en zona humeral.

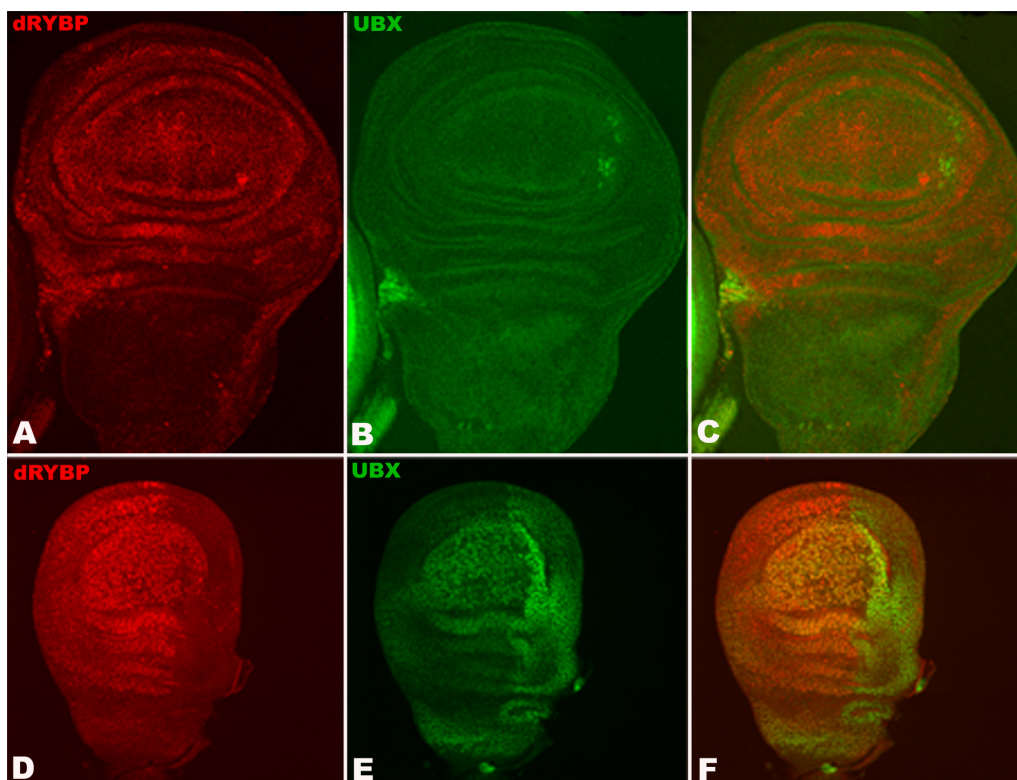


Figura 41. Efectos de la sobre-expresión de la proteína RYBP murina sobre la expresión de UBX. (A) Expresión de RYBP (rojo, teñido con anti-dRYBP) en disco de ala *sd-GAL4/UAS-RYBP*. (B) Expresión de UBX (verde). (C) Superposición de imágenes. (D) Expresión de RYBP (rojo) en disco de halterio *UAS-RYBP/+; Ubx-GAL4+*, (E) Expresión de UBX (verde) en disco de halterio *UAS-RYBP/+; Ubx-GAL4+*, mostrando represión de UBX debido a la sobre-expresión de RYBP. (F) Superposición de las imágenes.

Las transformaciones más fuertes se observaron en el caso de *sd-GAL4/UAS-dRYBP* produciéndose mayor cantidad de tricomas de halterio y reducción en el tamaño del ala (**Figura 40**). La sobre-expresión del gen RYBP de ratón, el homólogo de dRYBP produce los mismos fenotipos. (**Figura 41**).

Las alas de moscas *en-GAL4/UAS-dRYBP* también mostraban transformación hacia halterio, determinado por los tricomas de halterio encontrados en el compartimento posterior (**Figura 40**) y curiosamente también transformaciones indicativas de la inactivación del gen *engrailed*, como por ejemplo, la desaparición de la vena cuarta en el ala y aparición de pelos de la triple fila en el compartimento posterior del ala. En el notum, hay transformaciones del meso-notum posterior (T2p) a meso-notum anterior (T2a), lo cual ha sido previamente observado como un fenotipo de inactivación del gen *engrailed* (comunicación personal de Manuel Calleja). Se pudo observar también individuos en donde se ha producido un crecimiento de tejido de ala en húmero (**Figura 40**). Este último fenotipo se presenta en algunas mutaciones en el gen *trithorax* (Ingham, 1981) pero no se observa cuando se inducen clones mutantes para *trithorax* en el desarrollo larvario. (Ingham, 1985), lo que indica que esa transformación se debe a la pérdida de *trithorax* en estadios muy tempranos del desarrollo. Esta transformación por tanto debe estar relacionada con la inactivación de algunos de los genes regulados por *trithorax* como *engrailed* (Breen y cols., 1995).

Debido a los fenotipos observados, como los tricomas de halterio encontrados en el ala, se pensó que quizás existía una des-regulación en la proteína UBX. Se analizó la expresión de la proteína UBX en el disco de ala, la proteína UBX no se expresa en el disco de ala a excepción de en las células de la membrana peripodial (White y Wilcox, 1984). Se observó expresión de UBX en discos ala de larvas *638-GAL4/UAS-dRYBP*, *en-GAL4/UAS-dRYBP*, *nub-GAL4/UAS-dRYBP*

y 638-GAL4/UAS-dRYBP (**Figura 40**), lo que explicaba las transformaciones de ala a halterio de las correspondientes moscas adultas. Por tanto, la sobre-expresión de dRYBP es capaz de activar ectópicamente (o des-reprimir) la expresión de UBX en el ala, aunque, curiosamente, la expresión ectópica no abarca todo el dominio donde se sobre-expresa dRYBP.

También se estudio si esta des-represión de UBX era modulable por mutaciones en genes del grupo *Polycomb* y *trithorax*. Se sobre-expresó dRYBP utilizando *sd-GAL4* en fondos mutantes *Pc³*, *pho¹* y *trx^{E2}*. Moscas *sd-GAL4/+ UAS-dRYBP/+; Pc³/+* presentaban un gran incremento del fenotipo de transformación de ala en halterio respecto al observado en moscas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP/+*. También se produjo un incremento del fenotipo, aunque no tan severo, en moscas *sd-GAL4/+ UAS-dRYBP/+; pho¹/+* (**Figura 40**). La sobre-expresión en un fondo mutante *trx^{E2}/+* consiguió rescatar casi por completo el fenotipo producido por la sobre-expresión en fondo silvestre (**Figura 40**). Los fenotipos que se obtuvieron en los fondos mutantes para *Pc³* y *pho¹* se correspondieron con un incremento de la expresión ectópica de *Ubx* (**Figura 40**).

LA DES-REPRESIÓN DE UBX EN EL DISCO DE ALA OCURRE EN EL COMPARTIMENTO POSTERIOR

La des-represión de UBX inducida por la sobre-expresión de dRYBP en el ala esta restringida en el compartimento posterior y no coincide con todo el dominio donde dRYBP se está sobre-expresando (**Figura 42**) sino en unas células muy concretas, que parecen ser más sensibles a que UBX se des-reprima (**Figura 42**). Esto también ocurre en mutantes del PcG, ya que por ejemplo los moscas *Pc³/+* muestran una des-represión de UBX en el ala pero no en todo el ala, sino en esas células determinadas (Cabrera y cols., 1985). Para comprobar estos datos, se sobre-expresó dRYBP bajo el control de *ci-GAL4*, que dirige la expresión sólo

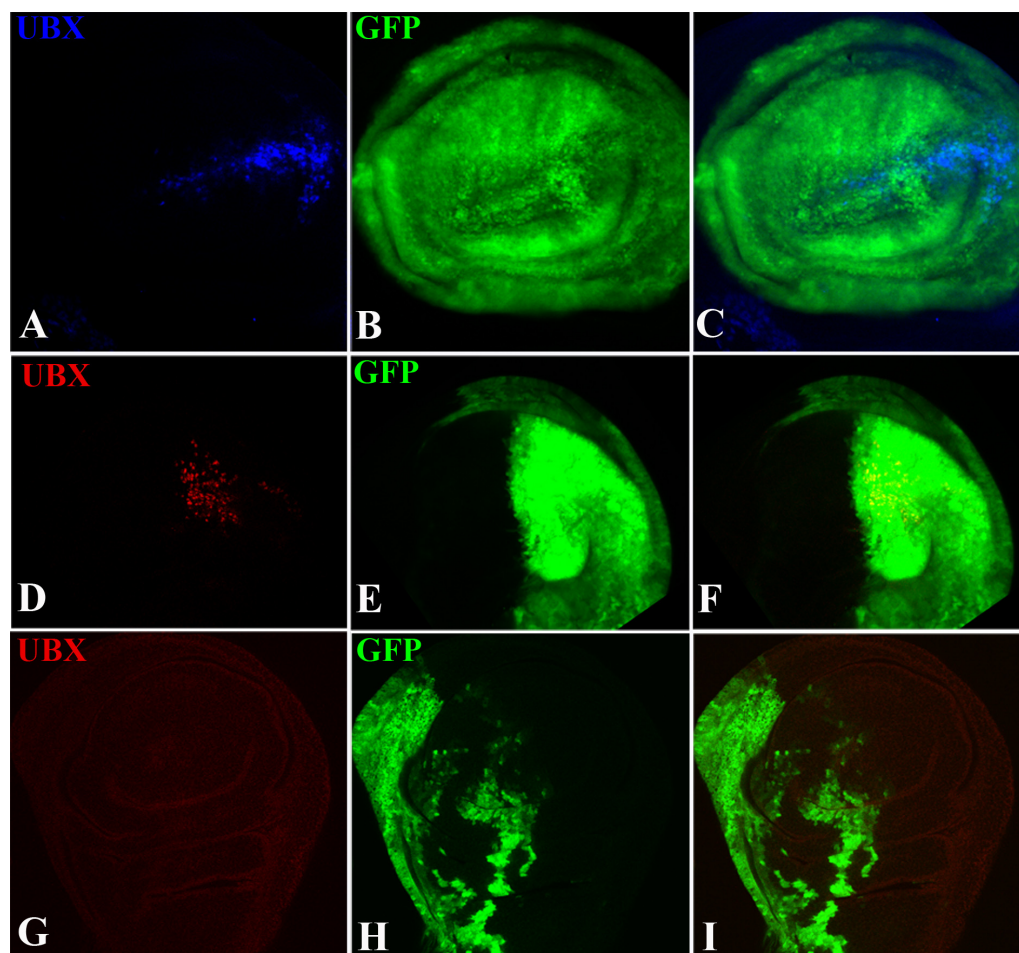


Figura 42. Localización de la des-represión de UBX, mediada por la sobre-expresión de dRYBP, en el disco de ala.

(A) Expresión de UBX (azul) en el disco de ala UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP. (B) Expresión de GFP (verde) en el disco de ala UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP mostrando el dominio de expresión dirigido por la línea nub-GAL4. (C) Superposición de imágenes A y B. (D) Expresión de UBX (rojo) en el disco de ala UAS-dRYBP/en-GAL4; UAS-GFP/+. (E) Expresión de GFP (verde) en disco UAS-dRYBP/en-GAL4; UAS-GFP/+, mostrando el dominio de expresión dirigido por la línea en-GAL4. (F) Superposición de imágenes D y E. (G) Expresión de UBX (rojo) en el disco de ala UAS-dRYBP/ci-GAL4; UAS-GFP/+. (H) Expresión de GFP (verde) en el disco de ala UAS-dRYBP/ci-GAL4; UAS-GFP/+, mostrando el dominio de expresión dirigido por la línea ci-GAL4. (I) Superposición de imágenes.

en el compartimento anterior. Los discos imaginales de ala de larvas *ci-GAL4/UAS-dRYBP* no presentan des-represión de UBX en el compartimento anterior a pesar de los altos niveles de proteína dRYBP (**Figura 42**).

Para investigar porqué solo algunas células del compartimento posterior son competentes a la des-represión de UBX, se analizó si la competencia era dependiente del estado de división celular, ya que la región posterior coincide con la región de expresión del factor mitogénico *string* (*cdc25*), que codifica una fosfatasa que en G2 activa a la *ciclina/cdc2* kinasa y dispara la mitosis (Edgar y O'Farrell, 1989). Se estudio la expresión de UBX en discos de ala de larvas *UAS-STG/nub-GAL4; UAS-dRYBP/+* (**Figura 43**). Los resultados aunque no fueron concluyentes, muestran que hay des-represión de UBX en el ala, dicha des-represión es bastante variable de unos discos a otros, pero sigue siendo en la misma zona, por tanto no parece tener relación con el estado de división en el que se encuentran las células.

Se realizó también el experimento contrario sobre-expresando dRYBP junto con SC (*scute*) que promueve que la células paren de dividirse para diferenciarse a células pro-neural

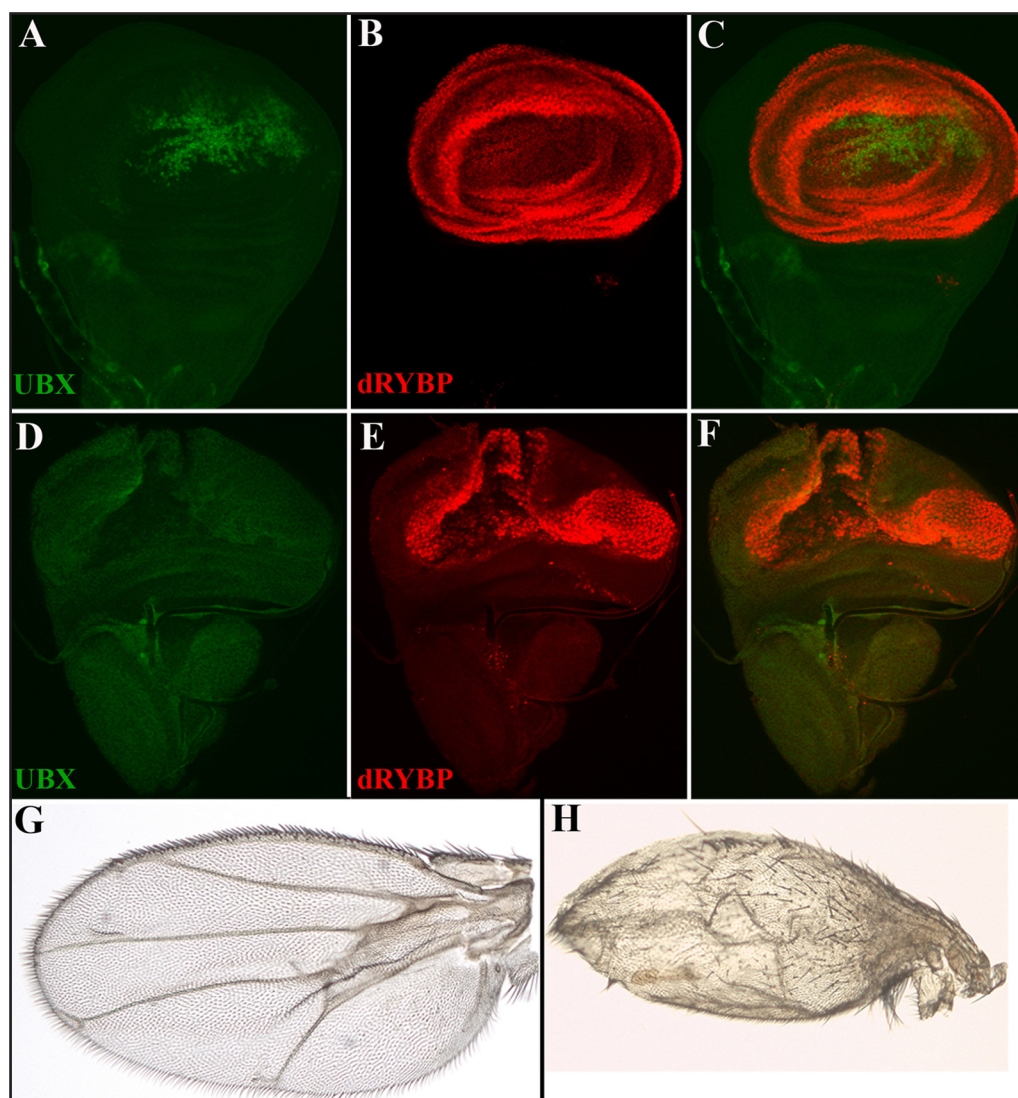


Figura 43. Efectos de la sobre-expresión conjunta de dRYBP y string y de dRYBP y scute. (A) Expresión de UBX (verde) en un disco de ala *UASstg/nubGAL4; UASdRYBP/+*. (B) Expresión de dRYBP (rojo) en un disco de ala *UASstg/nubGAL4; UASdRYBP/+*. (C) Superposición de las imágenes A y B. (D) Expresión de UBX (verde) en un disco de ala *UASsc39/nubGAL4; UASdRYBP/+*. (E) Expresión de dRYBP (rojo) en un disco de ala *UASsc39/nubGAL4; UASdRYBP/+*. (F) Superposición de las imágenes E y F. (G) Ala de una mosca *UASstg/nubGAL4; UASdRYBP/+*. (H) Ala de una mosca *UASsc39/nubGAL4; UASdRYBP/+*.

(Pilar Cubas, 1991). En este caso los discos de ala *UAS-SC39/nub-GAL4; UAS-RYBP/+* no presentan expresión de UBX (**Figura 43**) indicando que o bien la sobres-presión de *scute* inhibe la expresión de UBX en el ala o que bien es el estado de diferenciación de las células posteriores lo que hace que las células sean competentes a la des-represión mediada por altos niveles de dRYBP. Estos experimentos no han sido concluyentes y se requiere una mayor profundización para poder llegar a entender este fenómeno.

SOBRE-EXPRESIÓN DE *dRYBP* EN EL DISCO IMAGINAL DE PATA

Se sobre-expresó dRYBP con la línea *Ubx-GAL4* que dirige la expresión en el parasegmen- to 6 que, además del halterio, incluye la pata meta-torácica y el compartimento anterior del primer segmento abdominal. Las moscas *Ubx-GAL4/ UAS-dRYBP* presentan peines sexuales ectópicos en pata meta-torácica, y fenotipo Ultra-abdominal (**Figura 44**). Debido a que la formación de los peines sexuales en la pata pro-torácica, está dirigida por el gen homeótico *Sex combs reduced* (*Scr*) (Struhl, 1981) se quiso averiguar si este fenotipo era debido a la des-represión de *Scr* en pata meta-torácica. En efecto, como se muestra en la **Figura 44**, la aparición de los peines sexuales en la pata meta-torácica esta relacionada con la des-represión de SCR en la misma. Este resultado sugiere también que el gen homeótico *Scr* se ve afectado por altos niveles de expresión de dRYBP.

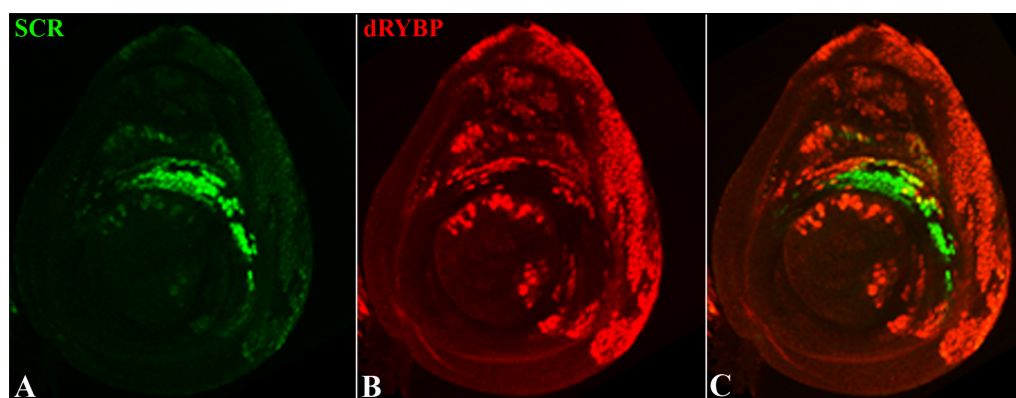


Figura 44. Efectos de la sobre-expresión de dRYBP en la expresión de la proteína homeótica SCR. La proteína SCR no se expresa en condiciones normales en los discos de pata meta-torácica (no mostrado) (A) Expresión de SCR (verde) en disco de pata meta-torácica *UAS-dRYBP/+; Ubx-GAL4+*. (B) Expresión de dRYBP (rojo) en discos *UAS-dRYBP/+; Ubx-GAL4+*. (C) Superposición de las imágenes.

Función del gen *dRYBP* en la apoptosis en *Drosophila*

La falta de función del gen dRYBP no parece afectar la regulación de la apoptosis ni en el embrión ni en los discos imaginales. Hemos estudiado la activación de la apoptosis con el método TUNEL, que marca el ADN fragmentado (Chen y cols., 1996), con el anticuerpo anti-caspasa-3 de humanos que reconoce la caspasa-3 activa de *Drosophila* (Fraser y Evan 1997, Fraser y cols. 1997) y con naranja de acridina (Abrams y cols., 1993) en embriones homocigóticos *dRYBP*^{P[KG0868]} / *dRYBP*^{P[KG0868]}, en ninguno de los casos hemos observado alteraciones en el patrón de apoptosis respecto a individuos silvestres. Tampoco, la tinción con el anticuerpo anti-caspasa 3 en discos imaginales de larvas *dRYBP*^{P[KG08683]} / *dRYBP*^{P[KG08683]} mostró una expresión alterada. Por último, la expresión de caspasa 3 en los discos imaginales de ala de larvas *RNAi_{RYBP} T2/en-GAL4; UAS-RNAi-^{T4/+}* es normal. Todos estos resultados sugieren que en condiciones normales, el gen *dRYBP* no esta involucrado en los mecanismos de regulación de la apoptosis en *Drosophila*.

Sin embargo, el estudio de los fenotipos generados por la sobre-expresión de dRYBP indicaban que la des-represión de los genes homeóticos no daba cuenta de la totalidad del fenotipo observado (**Figura 39 y 40**). Una posible explicación a estos fenotipos era que la sobre-expresión de dRYBP generara además de la des-represión de los genes homeóticos, la des-represión de otras proteínas involucradas en la morfogénesis del ala y del halterio. Estudiamos la expresión de las proteínas engrailed y de cubitus y no se detectaron grandes alteraciones en sus patrones de expresión. Decidimos investigar si la inducción de la muerte celular programada estaba involucrada en la generación de los fenotipos que se producen por altos niveles de la proteína dRYBP. Se estudió si la sobre-expresión de dRYBP activaba la vía apoptótica durante la embriogénesis y durante el desarrollo de los discos imaginales. Curiosamente, como se describe a continuación, solo se ha observado activación de la apoptosis en los discos imaginales de halterio y ala, no produciéndose activación de la apoptosis ni en los discos imaginales de pata ni de ojo-antena,

1. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE *dRYBP* INDUCE APOPTOSIS EN EL DISCO IMAGINAL DE HALTERIO

Los halterios de moscas *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP*, *nub-GAL4/UAS-dRYBP* y *sd-GAL4/UAS-dRYBP* aún presentando estructuras de ala y represión de UBX no crecen más de su tamaño normal (**Figura 39**), e incluso, son más pequeños de lo normal. Esto podría ser porque o bien las células no podían dividirse lo suficiente para dar un ala o bien las células se estaban muriendo por apoptosis, lo que explicaría el reducido tamaño. Se realizó una tinción con el anticuerpo anti-caspasa 3 de humanos, que reconoce la caspasa 3 activa, de discos de halterio de larvas *nub-GAL4/UAS-dRYBP* y de larvas control *nub-GAL4/+*, observándose activación de la apoptosis mediada por altos niveles de dRYBP (**Figura 45**). Esto explicaría que aún existiendo un cambio de identidad en el halterio debido a la represión de UBX, estos halterios no aumentan de tamaño. Se estudio si la apoptosis producida era dependiente de caspasas mediante la

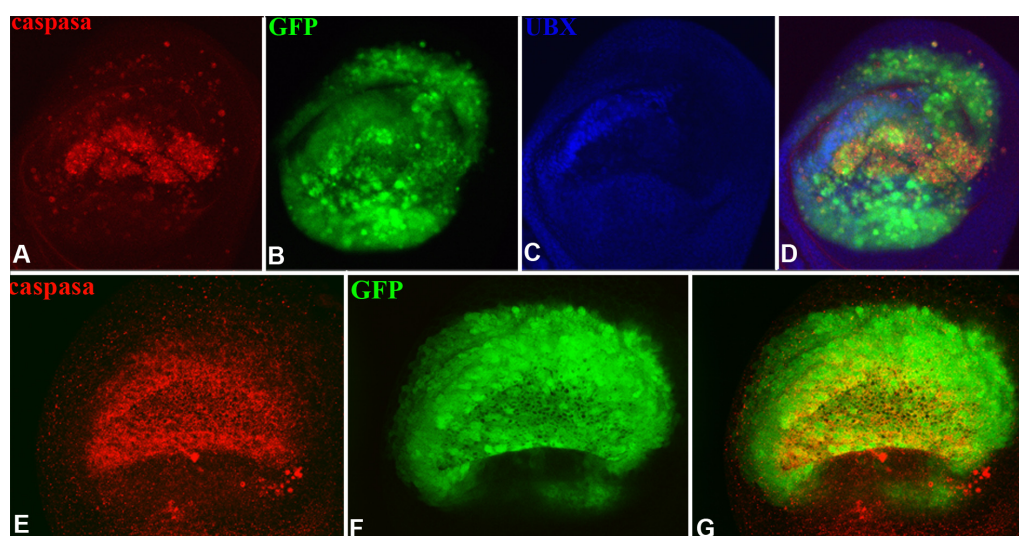


Figura 45. Efectos de la sobre-expresión de dRYBP en la activación de la apoptosis en el disco de halterio. (A) Expresión de la caspasa-3 (rojo) en el disco de halterio *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*, donde se observa la activación de la caspasa en todo el dominio de expresión. (B) Expresión de GFP (verde) en el disco de halterio *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*, mostrando el dominio de expresión dirigido por la línea *nub-GAL4*. (C) Expresión de UBX (azul) en el disco de halterio *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*, donde se observa que la expresión de UBX (azul) se reprime por la sobre-expresión de dRYBP. (D) Superposición de las imágenes A, B y C. (E) Expresión de caspasa 3 (rojo) en disco de halterio *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP; UAS-p35*, observándose la inactivación de la misma. Es de notar que la expresión de la caspasa se observa diferente que en A, ya que en este caso es la caspasa inactiva. (F) Expresión de GFP (verde) en disco de halterio *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*, mostrando el dominio de expresión dirigido por la línea *nub-GAL4*. (G) Superposición de las imágenes.

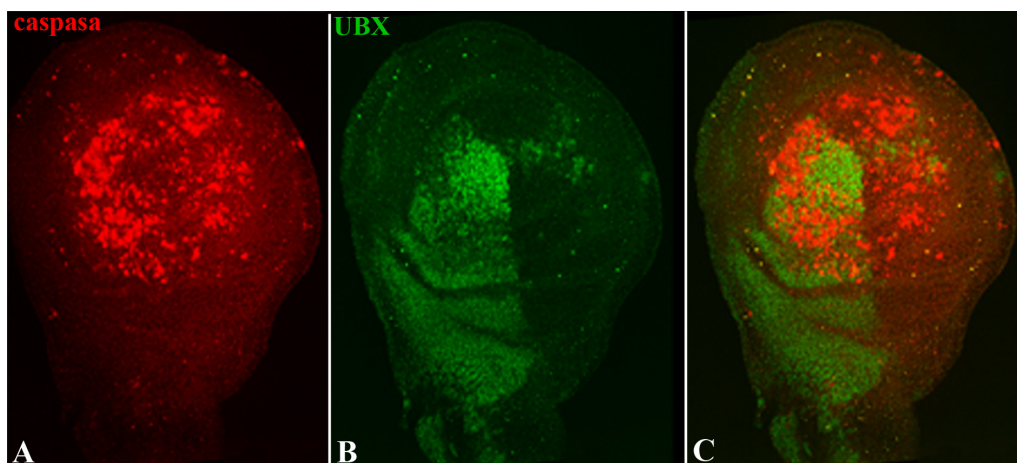


Figura 46. Relación entre la inducción de apoptosis y la expresión de UBX. (A) Expresión de caspasa 3 (rojo) en disco de halterio *UAS-dRYBP/nub-GAL4; pbx¹/pbx¹* (B) Expresión de UBX en disco de halterio *UAS-dRYBP/nub-GAL4; pbx¹/pbx¹*. (C) Superposición de imágenes.

sobre-expresión de p35, un inhibidor general de caspasas proveniente de baculovirus cuya expresión inhibe la muerte celular debido a que se une de manera irreversible a las caspasas (Clem y cols. 1991, Hay y cols. 1994). Como se muestra en la **Figura 45** discos de halterio de larvas *nub-GAL4/UAS-dRYBP; UAS-p35/+* no presentan una activación de la apoptosis y además los individuos adultos presentan un rescate parcial del fenotipo de “halterio peludo” indicando que este fenotipo es en gran parte producido por la activación de la apoptosis.

Los experimentos anteriores indicaban que en la generación del fenotipo “halterio peludo” la apoptosis estaba implicada, se quiso investigar si la activación de la apoptosis en el disco imaginal de halterio estaba relacionada con los niveles de expresión de la proteína UBX en el mismo. Por lo que se decidió estudiar la apoptosis en ausencia de expresión de UBX.

Para ello se examinó la inducción de apoptosis mediada por altos niveles de dRYBP en discos de halterio *pbx¹/pbx¹*. *pbx¹* es una mutación en el gen *Ubx* que deleta el elemento *pbx* cis-regulador de su expresión en el ps6. Individuos *pbx¹/pbx¹* presentan una transformación del compartimento posterior del halterio en el compartimento posterior del ala debido a la falta de expresión de UBX en el ps6. Se construyó el stock *UAS-dRYBP/nub-GAL4; ry⁵⁰⁶pbx¹e¹¹/TM6B* y se estudió la expresión de UBX y la caspasa-3 activa en los discos imaginales de halterio. Como se observa en la **Figura 46** tanto el compartimento anterior como el posterior del halterio muestran caspasa-3 activa debido a la sobre-expresión de dRYBP. Además, al igual que ocurre en las alas con altos niveles de expresión de dRYBP, el compartimento posterior del halterio ahora transformado a ala, expresa la proteína UBX. Por tanto, este experimento no nos permite concluir si en el halterio la expresión de UBX es necesaria para que la apoptosis tenga lugar.

2. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE dRYBP INDUCE APOPTOSIS EN EL DISCO IMAGINAL DEL ALA

Se estudió la expresión de la caspasa 3 en discos de ala de larvas *UAS-dRYBP/nub-GAL4* y se observó una fuerte activación de su expresión en comparación con los discos de ala de larvas *nub-GAL4* (**Figura 47**). Estos resultados indicaban que los fenotipos observados en las alas adultas *UAS-dRYBP/nub-GAL* son también parcialmente debidos a apoptosis. Para comprobar que el fenotipo era en parte debida a la apoptosis se sobre-expresó simultáneamente dRYBP y p35. Los discos *nub-GAL4/UAS-dRYBP; UAS-p35* no presenta activación de las caspasa y las moscas adultas muestran rescate del fenotipo debido a la sobre-expresión de dRYBP. Como se observa en la **Figura 47**, no existe correlación entre los dominios de activación ectópica de UBX y el dominio de activación de la apoptosis debida a la sobre-expresión de dRYBP.

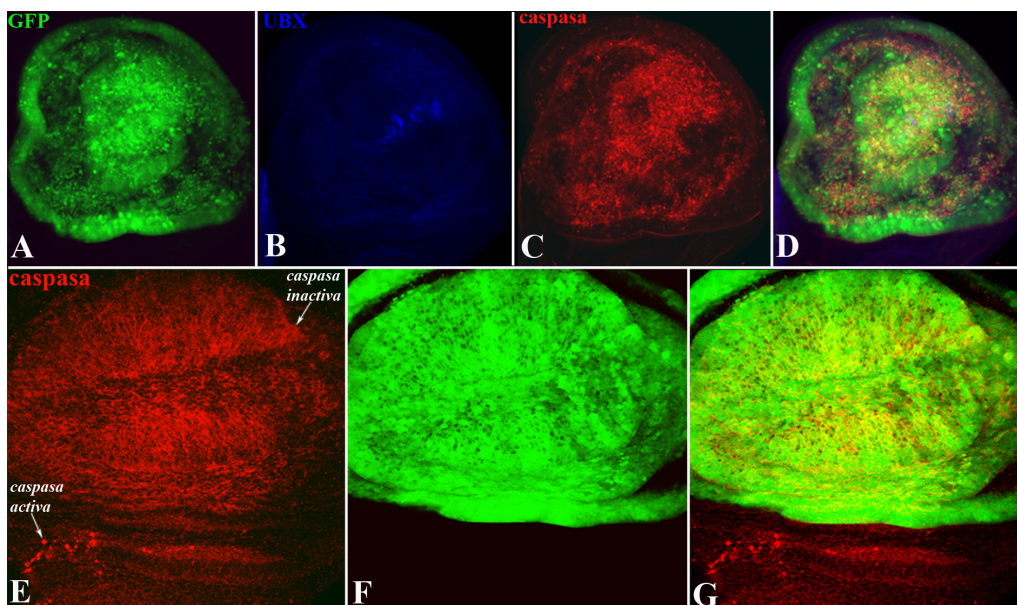


Figura 47. Efectos de la a sobre-expresión de dRYBP en la activación de la apoptosis en el disco imaginal de ala. (A) Expresión de GFP (verde) en el disco de ala *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*, mostrando el dominio de expresión que dirige la línea nub-GAL4. (B) Expresión de UBX (azul) en el disco de ala *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*, UBX se des-reprime debido a la sobre-expresión de dRYBP, solo en muy pocas células del disco. (C) Expresión de caspasa-3 (rojo) en el disco de ala *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*. Se observa inducción de apoptosis en todo el dominio donde dRYBP se sobre-expresa. (D) Superposición de las imágenes A, B, y C. (E) Expresión de caspasa-3 (rojo) en el disco de ala *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP; UAS-p35/+*. La expresión de la caspasa es diferente que en C ya que la caspasa se encuentra inactiva. (F) Expresión de GFP (verde) en el disco de ala *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*, mostrando el dominio de expresión que dirige la línea nub-GAL4. (G) Superposición de las imágenes.

Se estudió si la activación de la apoptosis se producía como mecanismos de respuesta a una activación de la proliferación debido a la sobre-expresión de dRYBP. Para ello, se realizó el estudio de la incorporación de Bromo-desoxiUridina (BrdU) que ocurre durante la fase S (síntesis) del ciclo celular, en la que se produce la duplicación el material genético. Se sobre-expresó dRYBP con la línea *ci-GAL4* y se comparó la incorporación de BrdU en ambos compartimentos (**Figura 48**), los resultados muestran que no parece haber diferencias en los niveles de BrdU en los compartimentos indicando que la muerte celular no se produce como respuesta a una activación de la proliferación.

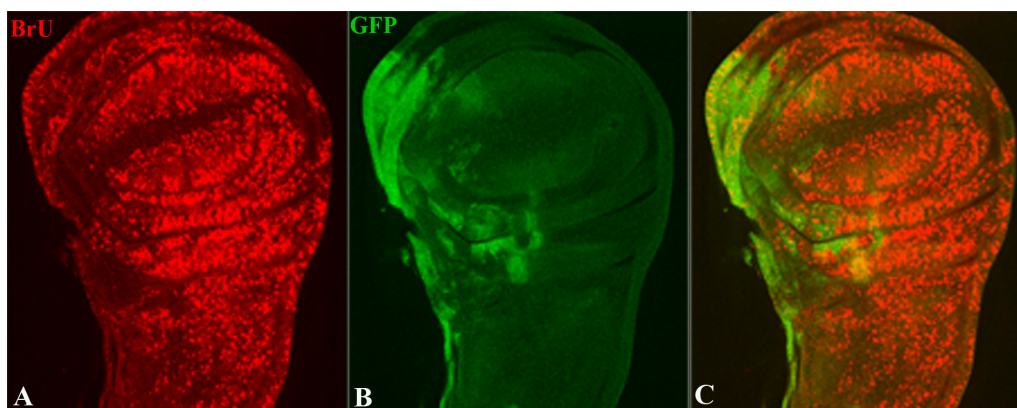


Figura 48. Efecto de la sobre-expresión de dRYBP en la proliferación en el disco de ala. (A) Expresión de BrdU (rojo) en el disco de ala *UAS-dRYBP/ci-GAL4; UAS-GFP/+*. (B) Expresión de GFP (verde) en el disco de ala *UAS-dRYBP/ci-GAL4; UAS-GFP/+*, mostrando el dominio de expresión dirigida por la línea *ci-GAL4* (I) Superposición de las imágenes.

FACTORES APOPTÓTICOS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN DE LA MUERTE CELULAR DEBIDO A LA SOBRE-EXPRESIÓN DE dRYBP

En *Drosophila* las vías apoptóticas incluyen la vía apoptótica extrínseca, para cuya activación se requiere un ligando extracelular y la vía apoptótica intrínseca la cual se activa por agentes externos como por ejemplo, irradiación celular (Locksley y cols. 2001). Para diferenciar en cual de éstas vías actuaba dRYBP, se irradiaron larvas homocigóticas mutantes *dRYBP*^{P[KG0868]} / *dRYBP*^{P[KG0868]} y larvas silvestres. Se estudió la expresión de la caspasa 3 y no se observó diferencias en los niveles de apoptosis entre discos silvestres y discos mutantes para dRYBP, descartándose un papel de dRYBP en la vía apoptótica intrínseca.

Las vías apoptóticas en *Drosophila* involucran la actuación de muchos factores entre ellos las caspasas, cuya activación produce la muerte celular irreversible (**Figura 59** de la discusión). Por ello la regulación de las caspasas es fundamental en la regulación de la apoptosis. En *Drosophila*, se han identificado dos grupos de proteínas involucrados en la regulación de la actividad de las caspasas: 1) las proteínas pro-apoptóticas que son fundamentales para la activación de la maquinaria apoptótica: *reaper* (*rpr*), *head involution defective* (*hid*), *grim*, *sickle* (*skl*) y *jafrac2* y 2) las proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (IAP Inhibitor of Apoptosis Proteins) que actúan inhibiendo la actividad catalítica de las caspasas (Hay y cols., 2004). Se han caracterizado dos IAPs en *Drosophila*: DIAP1 y DIAP2. La falta de función de DIAP1 produce muerte embrionaria como consecuencia de apoptosis masiva, mientras que la expresión ectópica de DIAP1 suprime la muerte celular inducida por *Rpr*, *Hid* o *Grim* (Goyal y cols., 2000). Las proteínas pro-apoptóticas interactúan con las proteínas IAP impidiendo su interacción con las caspasas y por tanto activando la muerte celular (**Figura 59**).

Para analizar los factores involucrados en la apoptosis mediada por la sobre-expresión de dRYBP, se estudio la inducción de la muerte celular en ausencia de algunos de los genes pro-apoptóticos y en presencia de altos niveles de proteínas inhibidoras de la apoptosis. Se analizó la expresión de la caspasa 3 en discos imaginales de ala de larvas *nub-GAL4/UAS-DIAP; UAS-dRYBP/+*. Se observó que altos niveles de la proteína DIAP-1 suprime casi por completo la apoptosis inducida por la sobre-expresión de dRYBP (**Figura 49**). Por otro lado se estudió la inducción de la apoptosis en ausencia de una dosis de los genes pro-apoptóticos *Rpr*, *Hid* o *Grim* contenidos en la *Df(3)H99*, que provoca una reducción significativa de la apoptosis incluso en heterocigosis (Goyal y cols., 2000) (Brodsky y cols., 2004). Discos imaginales de larvas *UAS-dRYBP/nub-GA4; Df(3)H99/+* muestran una considerable reducción de la apoptosis

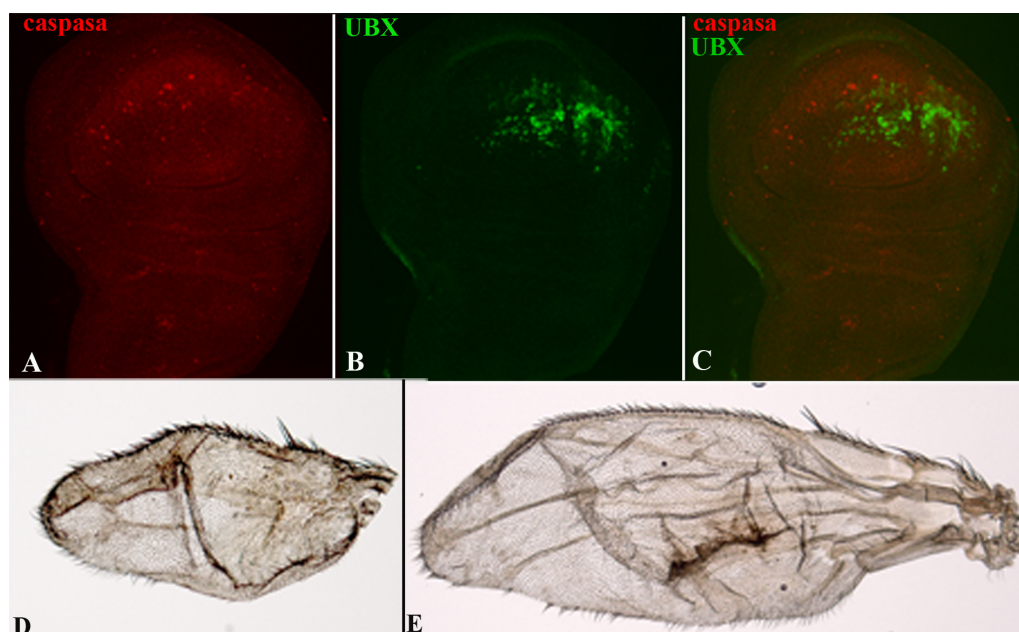


Figura 49.
Efecto de DIAP
en la inducción de la
apoptosis debida a la
sobre-expresión de
dRYBP. (A) Expresión de caspasa-3 (rojo) en el disco de ala *nub-GAL4-UAS-DIAP; UAS-dRYBP*. Se observa inhibición de la activación de la apoptosis (comparar con Figura 47A). (B) Expresión de UBX (verde) en el disco de ala *nub-GAL4-UAS-DIAP; UAS-dRYBP*. La expresión de UBX debida a los altos niveles de dRYBP no se altera (compara con Figura 40A). (C) Superposición de las imágenes. (D) ala de adulto *nub-GAL4/UAS-dRYBP*. (E) ala de adulto *nub-GAL4-UAS-DIAP; UAS-dRYBP/+*.

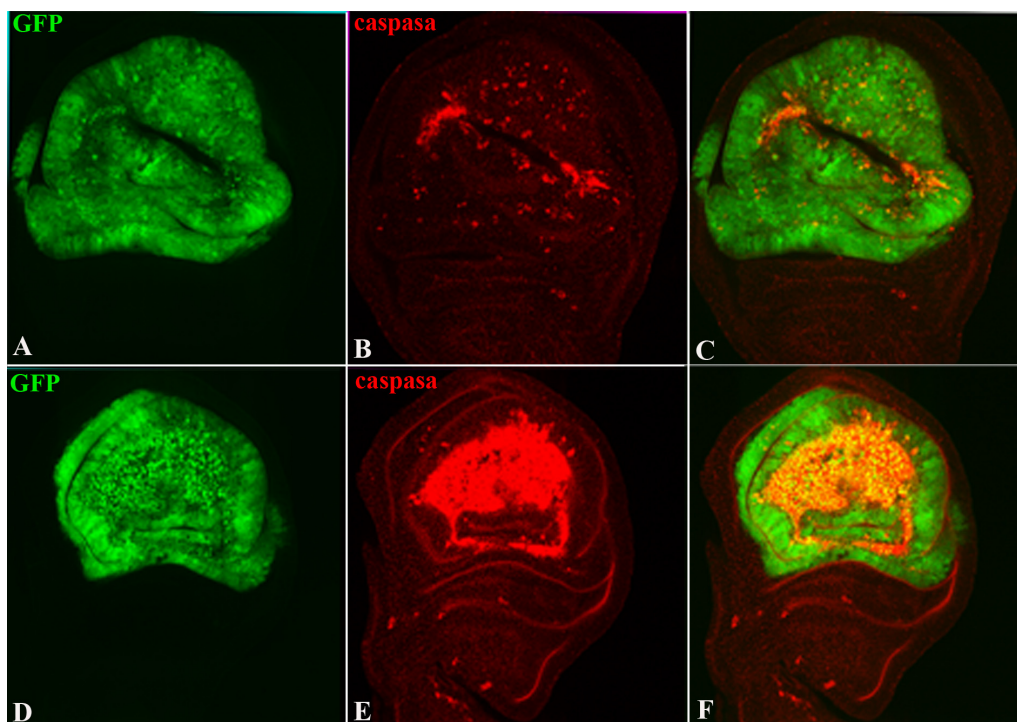


Figura 50. Efecto de la ausencia de los factores pro-apoptóticos en la inducción de apoptosis debida a la sobre-expresión de dRYBP. La Df H99 elimina los genes pro-apoptóticos *reaper*, *hid* y *grim*. (A) Expresión de GFP (verde) en el disco de ala *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*, mostrando el dominio de expresión que dirige la línea *nub-GAL4*. (B) Expresión de caspasa-3 (rojo) en el disco de ala *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*; *DfH* (99). La activación de la apoptosis se reduce si se compara con la Figura E. (C) Superposición de las imágenes A, B. (D) Expresión de GFP (verde) en el disco de ala *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*, mostrando el dominio de expresión que dirige la línea *nub-GAL4*. (E) Expresión de caspasa-3 (rojo) en el disco de ala *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*. (F) Superposición de las imágenes.

inducida por altos niveles de dRYBP (**Figura 50**). Estos resultados indican que la activación de la apoptosis mediada por la sobre-expresión de dRYBP en el disco de ala depende de las proteínas pro-apoptóticas y de las proteínas IAP (inhibidoras de la apoptosis).

En mamíferos, la vía apoptótica extrínseca (**Figure 59**) se activa mediante la estimulación de TNF (*factor necrótico tumoral*), que recluta la proteína adaptadora FADD y agrega distintas moléculas de pro-caspasa-8, la proteína iniciadora de la apoptosis inducida por ligando. En células T 293 se ha visto una interacción de DEDAF/RYPB con la proteína adaptadora FADD (Zheng y cols., 2001) y una interacción de RYPB/DEDAF con la pro-caspasa-8 (Zheng y cols., 2001).

En *Drosophila*, el homólogo al TNF es la proteína EIGER que es una potente inductora de la apoptosis. La inducción de la apoptosis mediada por EIGER depende completamente de la vía de JNK (Moreno y cols., 2002). Sin embargo, no requiere la función de DREDD (el homólogo a la pro-caspasa8 en mamíferos) que interacciona físicamente con FADD de *Drosophila* (Leulier y cols., 2000, Hu y Yang, 2000). Por el momento no se sabe si la inducción de apoptosis mediada por Eiger es dependiente de dFADD o si dFADD por si misma esta involucrada en la regulación de la apoptosis en *Drosophila*.

Debido a las interacciones moleculares descritas en mamíferos entre las proteínas FADD, pro-caspasa-8 y RYPB/DEDAF, quisimos estudiar si la inducción de apoptosis mediada por altos niveles de dRYBP estaba mediada por la presencia o ausencia de estas proteínas. Para ello se estudió la expresión de las caspasa 3 en discos de ala de larvas *w*; *UAS-RNAi_{FADD}M8/nub-GAL4*; *UAS-RYPB/+* (Naitza y cols., 2002) y se observó falta de apoptosis mediada por la sobre-expresión de dRYBP (**figura 51**). Por otro lado, se analizó la expresión de la caspasa 3 en discos de ala de larvas *dredd/dredd*; *nubGAL4/UASdRYBP*, y se observó que la apoptosis

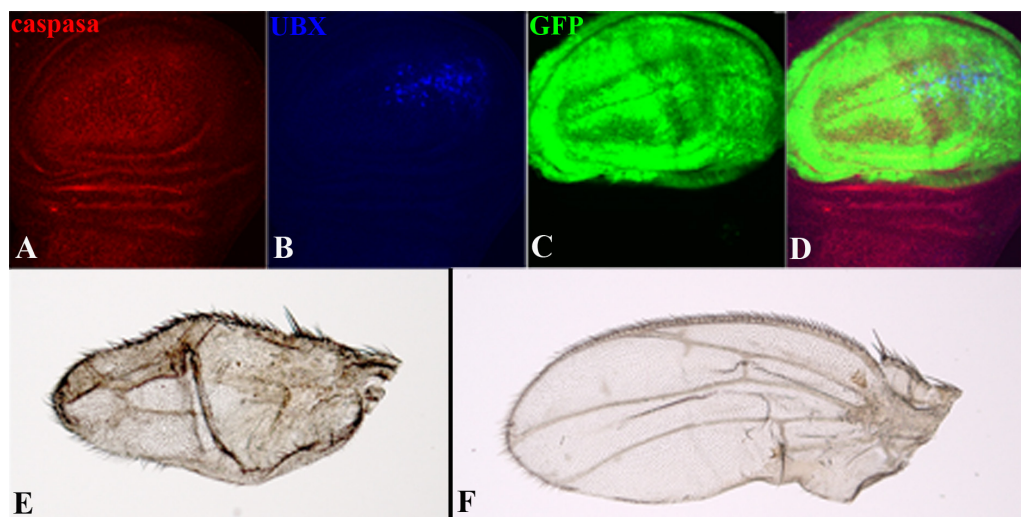


Figura 51. Efecto de la ausencia de dFADD (Factor asociado al Dead Domain) en la inducción de apoptosis debido a la sobre-expresión de dRYBP. (A) Expresión de caspasa-3 (rojo) en el disco de ala *UAS-RNAi_{dFADD}/M8/nubGAL4; UAS-RYBP/+*. Se observa inhibición de la inducción de la apoptosis (comparar con Figura 31A). (B) Expresión de UBX (azul) en disco de ala *UAS-RNAi_{dFADD}/M8/nubGAL4; UAS-RYBP/+*. La des-represión de UBX no se afecta. (C) Expresión de GFP (verde) mostrando el dominio de expresión dirigido por la línea nub-GAL4. (D) Superposición de las imágenes. (E) Ala de adulto *nub-GAL4/UAS-dRYBP*. (F) Ala de adulto *UAS-RNAi_{dFADD}/M8/nubGAL4; UAS-RYBP/+*.

debida a la sobre-expresión de dRYBP no tenía lugar (**figura 52**). Estos resultados indican que tanto dFADD como DREDD son necesarios para la inducción de la apoptosis producida por la sobre-expresión de dRYBP.

Como se ha comentado anteriormente, la vía extrínseca de *Drosophila* depende completamente de la vía de JNK (Moreno y cols., 2002). Para examinar si la sobre-expresión de dRYBP activa la vía de JNK, se estudio la expresión de *puckered*, una fosfatasa cuya expresión se

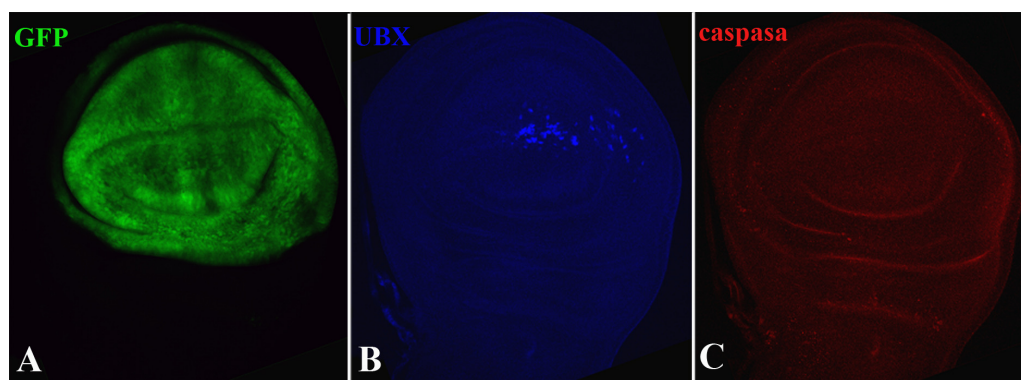


Figura 52. Efecto de la ausencia de dredd en la inducción de apoptosis debido a la sobre-expresión de dRYBP Apoptosis en discos de ala *dreddD45 / dreddD45; nubGAL4/UASdRYBP* (A) Expresión de GFP (verde) mostrando el dominio de expresión dirigido por la línea nub-GAL4 en el disco de ala *dreddD45 / dreddD45; nubGAL4/UASdRYBP*. (B) Expresión de UBX (azul) en el disco de ala *dreddD45 / dreddD45; nubGAL4/UASdRYBP*. La expresión de UBX no se altera. (C) Expresión de caspasa-3 (rojo) en disco de ala *dreddD45 / dreddD45 nubGAL4/UASdRYBP*. Se observa inhibición de la apoptosis (comparar con Figura 31A).

induce por la vía JNK (Adachi-Yamada y cols., 1999). Se analizaron discos de ala de larvas *nub-GAL4/UAS-dRYBP; puckered-lacZ/+* y no parece observarse una inducción de la expresión del *lacZ*, indicando que la inducción de la apoptosis debido a la sobre-expresión de dRYBP no está mediada por la vía de JNK.

Función de los dominios de la proteína dRYBP en la activación de la apoptosis y de la expresión de UBX.

La proteína dRYBP contiene dos dominios diferenciados que son el Zn Finger y el dominio C-terminal (**Figura 18** y pagina 35 para la descripción detallada de los mismos). Los fenotipos más destacados que se producían por la sobre-expresión de la proteína dRYBP eran la activación de la apoptosis y la activación o des-represión de la expresión de la proteína homeótica UBX. Se estudió la función de los dominios de la proteína dRYBP en la generación de los mismos, para lo que se diseñaron las siguientes construcciones (**Figura 53** y Materiales y Métodos):

- dRYBP-ΔZF, que deletiona el dominio Zn-finger.
- dRYBP-ZF_{mut}, que tiene mutadas puntualmente las Cisteínas que forman el dominio Zn-finger y de ésta forma se inactiva su función
- dRYBP-ΔCt, que tiene una delección de todo el dominio C-terminal.

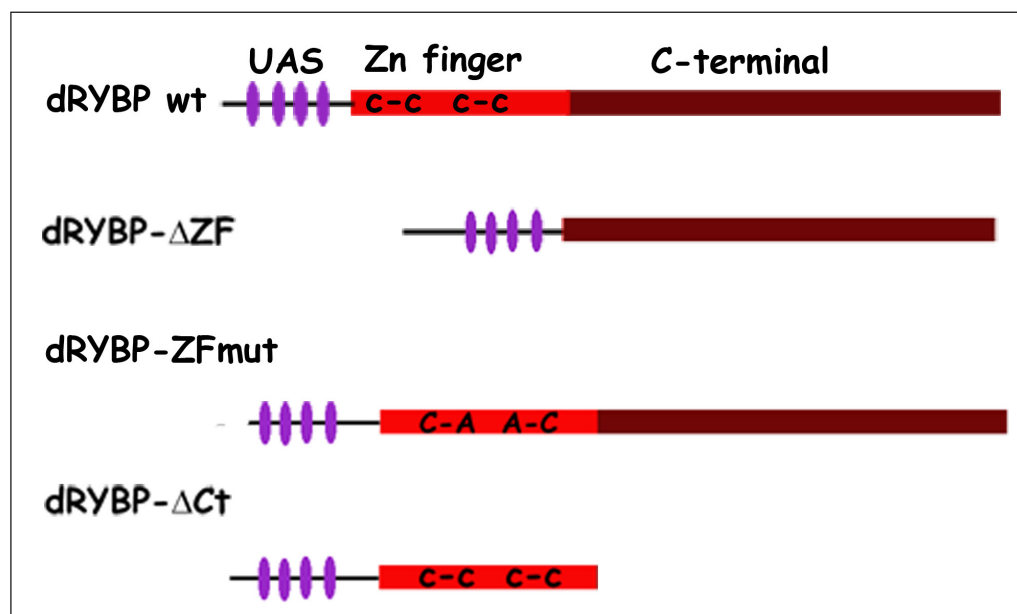


Figura 53. Esquema de las construcciones de la proteína dRYBP. La proteína dRYBP tiene dos dominios, el Zn-finger (rojo) y el C-terminal (marrón). Todas las construcciones contienen las secuencias UAS (moradas). dRYBP wt: contiene toda la proteína dRYBP. dRYBP-ΔZF: contiene el C-terminal de la proteína dRYBP. dRYBP-ZF_{mut}: contiene la proteína entera con el Zn-finger puntualmente mutado en la Cys C25A y C28A. dRYBP-ΔCt: contiene el Zn finger de la proteína dRYBP.

Para la sobre-expresión se utilizó el sistema GAL4/UAS y las líneas *sdGAL4* y *UbxGAL4*. Las moscas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP-ΔZF/+* muestran un fenotipo en las alas muy similar que el que se observa en las moscas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP*. También, la expresión de UBX se des-reprime en el disco de ala de una forma muy similar a los discos de larvas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP* (**Figura54**). Estos resultados sugieren que en la generación de los fenotipos observados por la sobre-expresión de dRYBP, el dominio Zn-Finger no tiene un papel fundamental. Curiosamente, se observó que la proteína dRYBP en los discos *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP-ΔZF/+* se localizaba fuera del núcleo, poniendo en evidencia la existencia de una señal de localización nuclear en el dominio proteico deletcionado. Aunque no hemos podido detectar proteína dRYBP en el núcleo, lo más probable es que se exprese ya que es capaz de activar la expresión de la proteína UBX.

Sorprendentemente, cuando se examinó la expresión de la caspasa 3 como marcador

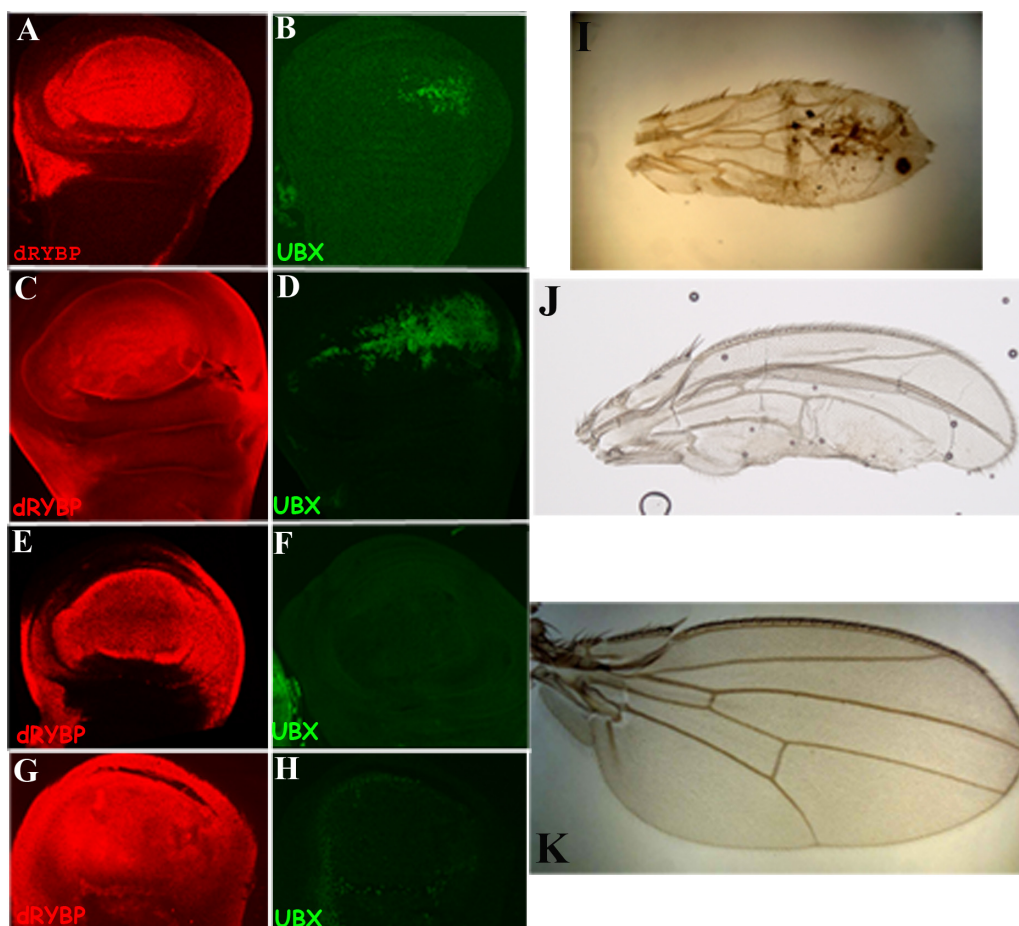


Figura 54. Estudio de las funciones de los dominios de la proteína dRYBP: Sobre-expresión de las proteínas mutantes de dRYBP. (A) Expresión de dRYBP (rojo) en disco de ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP*. (B) Expresión de UBX (verde) en el disco de ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP*. (C) Expresión de dRYBP (rojo) en disco de ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP-ΔZF*, nótese que la expresión está fuera del núcleo. (D) Expresión de UBX (verde) en el disco de ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP-ΔZF*. (E) Expresión de dRYBP (rojo) en el disco de ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP-ΔZF_{mut}*. (F) Expresión de UBX (verde) en el disco de ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP-ΔZF_{mut}*. (G) Expresión de dRYBP (rojo) en el disco de ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP-ΔCt*. (H) Expresión de UBX (verde) en el disco de ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP-ΔCt*. (I) Ala adulta de individuos *sd-GAL4/UAS-dRYBP*. (J) Ala adulta de individuos *sd-GAL4/UAS-dRYBP-ΔZF*. (K) Ala adulta de individuos *sd-GAL4/UAS-dRYBP-ΔZF_{mut}* y *sd-GAL4/UAS-dRYBP-ΔCt*.

de la apoptosis, y a diferencia de lo que ocurre al sobre-expresar dRYBP, los discos de larvas *UAS-dRYBP-ΔZF/+; nub-GAL4/+* no muestra activación de la muerte celular mas allá de la que normalmente aparece (Figura 55).

Los halterios de las moscas *UAS-dRYBP-ΔZF/+; Ubx-GAL4/+* presentaron el mismo fenotipo que *UAS-dRYBP/+; Ubx-GAL4/+*. Además, los discos imaginales de halterio de larvas *UAS-dRYBP-ΔZF/+; Ubx-GAL4/+* mostraron similar patrón de expresión la proteína UBX que los discos *UAS-dRYBP; Ubx-GAL4/+* (Figura 56). Estos resultados indicaban que para la generación del fenotipo de “halterio peludo” y su correspondiente represión de la proteína UBX, el dominio Zn Finger es dispensable.

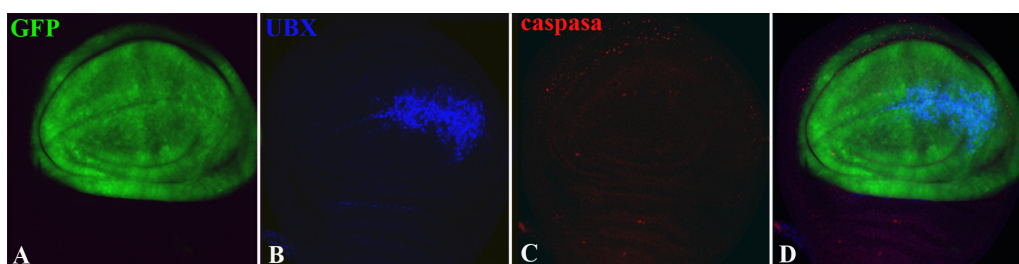
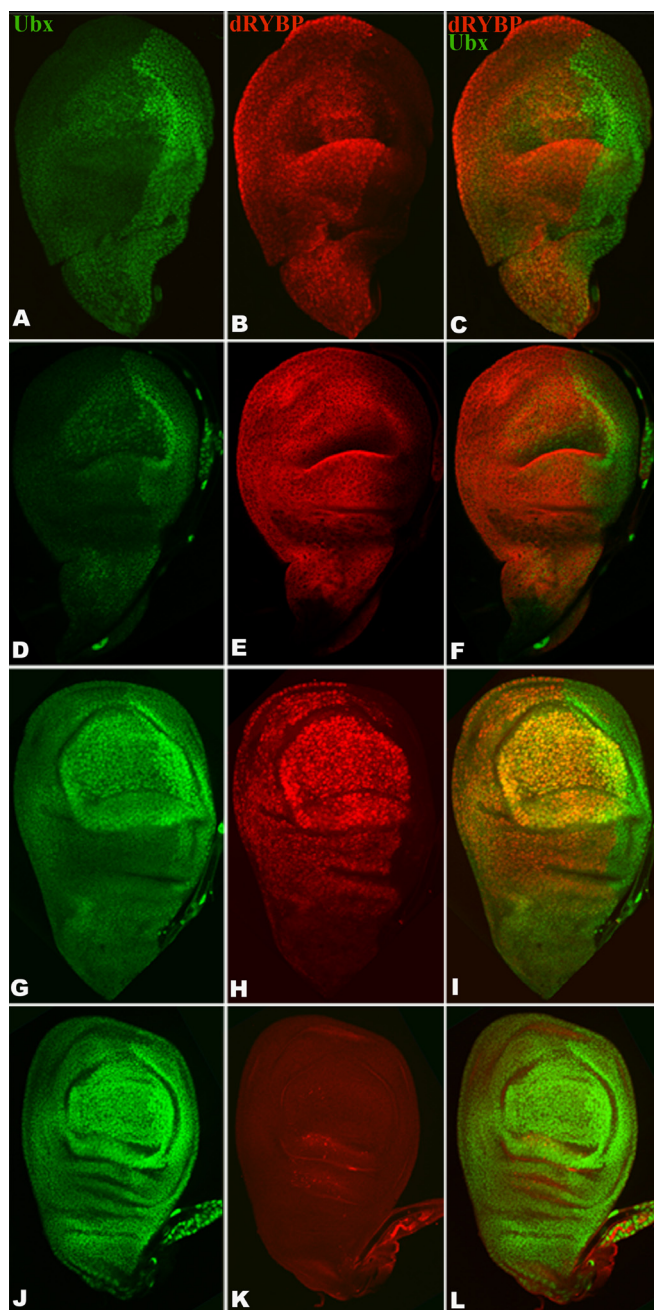


Figura 55. Estudio de las funciones de los dominios de la proteína dRYBP: Efecto sobre la inducción de apoptosis en el disco de ala (A) Expresión de GFP (verde) en el disco *nub-GAL4/UAS-dRYBP-ΔZF* mostrando el dominio de expresión dirigido por la línea *nub-GAL4*. (B) Expresión de UBX (azul) en el disco de ala *nub-GAL4/UAS-dRYBP-ΔZF*. (C) Expresión de caspasa-3 en el disco de ala *nub-GAL4/UAS-dRYBP-ΔZF*, comparar con la Figura 47A. (D) Superposición de las imágenes.

Figura 56. Estudio de las funciones de los dominios de la proteína dRYBP: Efecto sobre la represión de UBX en el disco de halterio.

(A) Expresión de UBX (verde) en el disco de halterio *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP*. (B) Expresión de dRYBP (rojo) en el disco de halterio *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP*. (C) Superposición de imágenes A y B de la tinción. (D) Expresión de UBX (verde) en el disco de halterio *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP-ΔZF*. (E) Expresión de dRYBP (rojo) en el disco de halterio *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP-ΔZF*, nótese que la expresión está fuera del núcleo. (F) Superposición de las imágenes D y E. (G) Expresión de UBX (verde) en el disco de halterio *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP-ZF_{mut}*. (H) Expresión de dRYBP (rojo) en el disco de halterio *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP-ZF_{mut}*. (I) Superposición de las imágenes G y H. (J) Expresión de UBX (verde) en el disco de halterio *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP-ΔC₁*. (K) Expresión de dRYBP (rojo) en el disco de halterio *Ubx-GAL4/UAS-dRYBP-ΔC₁*. (L) Superposición de las imágenes.



Las moscas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP-ZF_{mut}/+* no presentan fenotipo en las alas adultas, los discos de ala no presentan des-represión de UBX y no presentan activación ectópica de la apoptosis. La proteína dRYBP se está expresando correctamente en el núcleo (**figura 54**) pero aparentemente no es funcional. De la misma forma, los halterios de las moscas *UAS-dRYBP-ZF_{mut}/+; Ubx-GAL4/+* son normales.

Las moscas *sd-GAL4/+; UAS-dRYBP-ΔC₁/+*, que solo contienen el dominio del Zn Finger, tampoco presentan fenotipo en las alas. Además el anticuerpo anti-dRYBP no es capaz de reconocer esta proteína mutante, aunque parece observarse una débil señal difusa por toda la célula. (**Figura 54**), De la misma forma, los halterios de las moscas *UAS-dRYBP-ΔC₁/+; Ubx-GAL4/+* son normales.

Efecto de la sobre-expresión de proteínas PcG y trxG en la regulación de la expresión de la proteína UBX y en la apoptosis

Nuestros resultados mostraban que la actividad transcripcional represora de la proteína dRYBP es dependiente de las proteínas PcG y trxG. Por otro lado, los altos niveles de dRYBP producen efectos en la regulación de proteínas homeóticas y en la apoptosis. Se quiso por tanto estudiar si estas capacidades reguladoras de dRYBP son comunes con otras proteínas del grupo PcG y trxG. Para ello se estudió los efectos de la sobre-expresión de *Polycomb*, y de *Sex comb extra* ambos de PcG y de *trithorax* de trxG.

Los discos imaginales de ala de las larvas *UAS-PC/nub-GAL4* no mostraban activación de la caspasa-3 ni des-represión de la proteína UBX (**Figura 57**). Lo mismo ocurría con los discos imaginales de ala de larvas *UAS-Sce/nub-GAL4*. Los individuos adultos resultantes presentaban alas normales.

Sin embargo los discos imaginales de *UAS-trx/nub-GAL4* presentan activación de la caspasa-3 y des-represión de UBX (**Figura 57**). Las alas adultas resultantes están totalmente transformadas a halterio. Estos resultados indican que la sobre-expresión de *trithorax*, un miembro de *trxG* produce fenotipos similares a dRYBP.

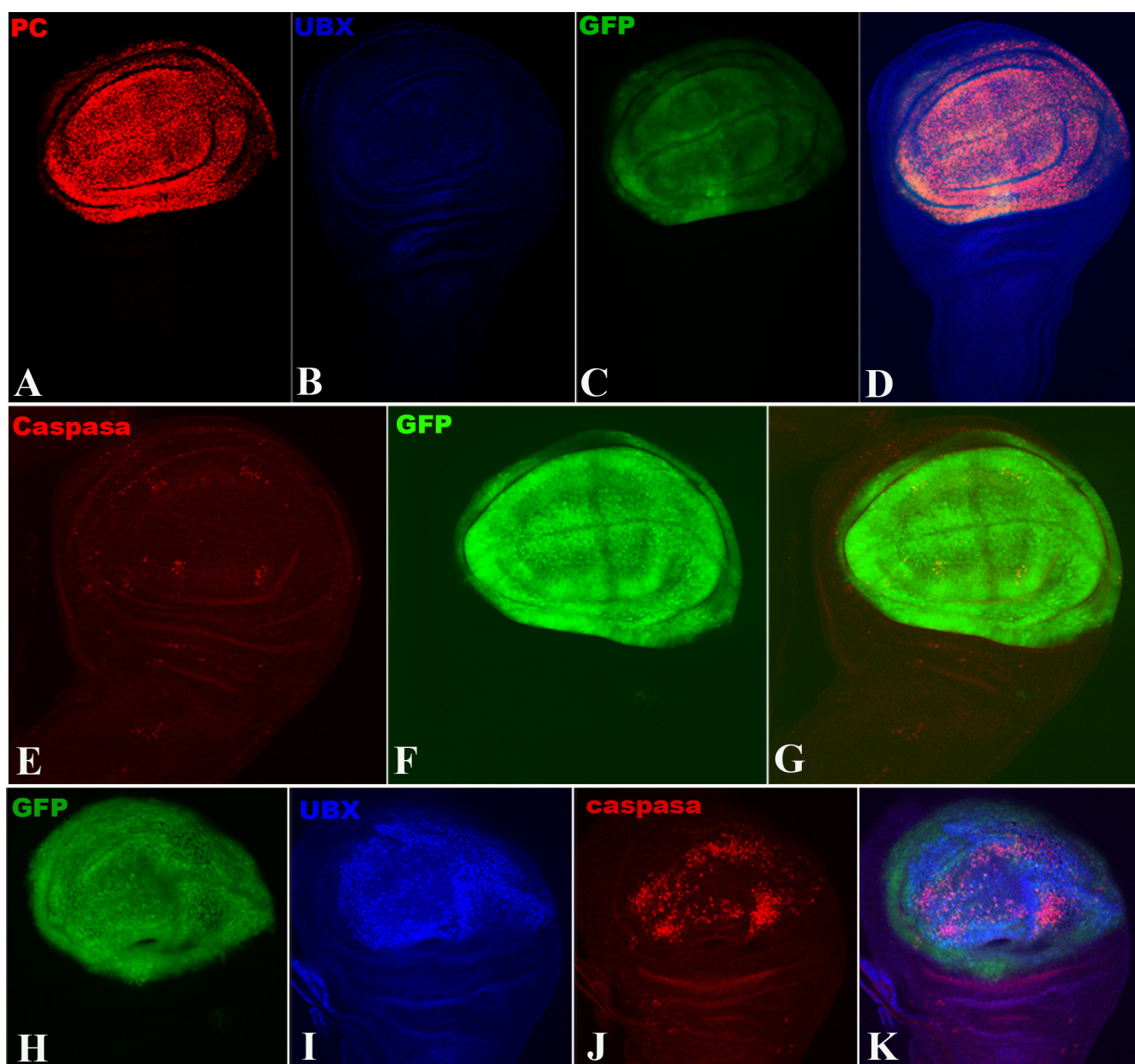


Figura 57. Efecto de la sobre-expresión de la proteína Polycomb en la inducción de la apoptosis y la expresión de UBX en discos de ala y halterio *UAS-Pc/GAL4*. (A) Expresión de PC (rojo) en el disco de ala *UAS-Pc/nub-GAL4-UAS-GFP*. (B) Expresión de UBX (azul) en el disco de ala *UAS-Pc/nub-GAL4-UAS-GFP*. (C) Expresión de GFP (verde) mostrando el dominio de expresión dirigido por la línea *nub-GAL4*. (D) Superposición de las imágenes A, B y C. (E) Expresión de caspasa (rojo) en el disco de ala *UAS-Pc/nub-GAL4-UAS-GFP*. (F) Expresión de GFP (verde) mostrando el dominio de expresión dirigido por la línea *nub-GAL4*. (G) Superposición de las imágenes E y F. (H-K) Efecto de la sobre-expresión de la proteína trithorax en la inducción de la apoptosis y la expresión de UBX en el disco de ala. (H) Expresión de GFP (verde) en el disco de ala *UAS-trx/nub-GAL4-UAS-GFP*, mostrando el dominio de expresión dirigido por la línea *nub-GAL4*. (I) Expresión de UBX (azul) en el disco de ala *UAS-trx/nub-GAL4-UAS-GFP*, se observa la des-represión de UBX. (J) Expresión de caspasa-3 (rojo) en el disco de ala *UAS-trx/nub-GAL4-UAS-GFP*, indicando la activación de la apoptosis. (K) Superposición de imágenes.

También se estudió si la apoptosis era modulable por mutaciones en genes del grupo *Polycomb* y *trithorax*. Se sobre-expresó dRYBP utilizando *nub-Gal4* en fondos mutantes *Pc³*, y *trx^{E2}*. Las moscas *UAS-dRYBP/nub-Gal4; Pc³/+* como se describe anteriormente presentaban un gran incremento del fenotipo de transformación de ala en halterio observado en la sobre-expresión de dRYBP en el fondo silvestre (**Figura 58**). Este incremento de fenotipo parece que sólo se debe a un aumento en la des-represión de UBX ya que la apoptosis está en los mismos niveles que la sobre-expresión de dRYBP en fondo silvestre. En la sobre-expresión en un fondo mutante *trx^{E2}/+* como se menciona anteriormente casi se rescata el fenotipo

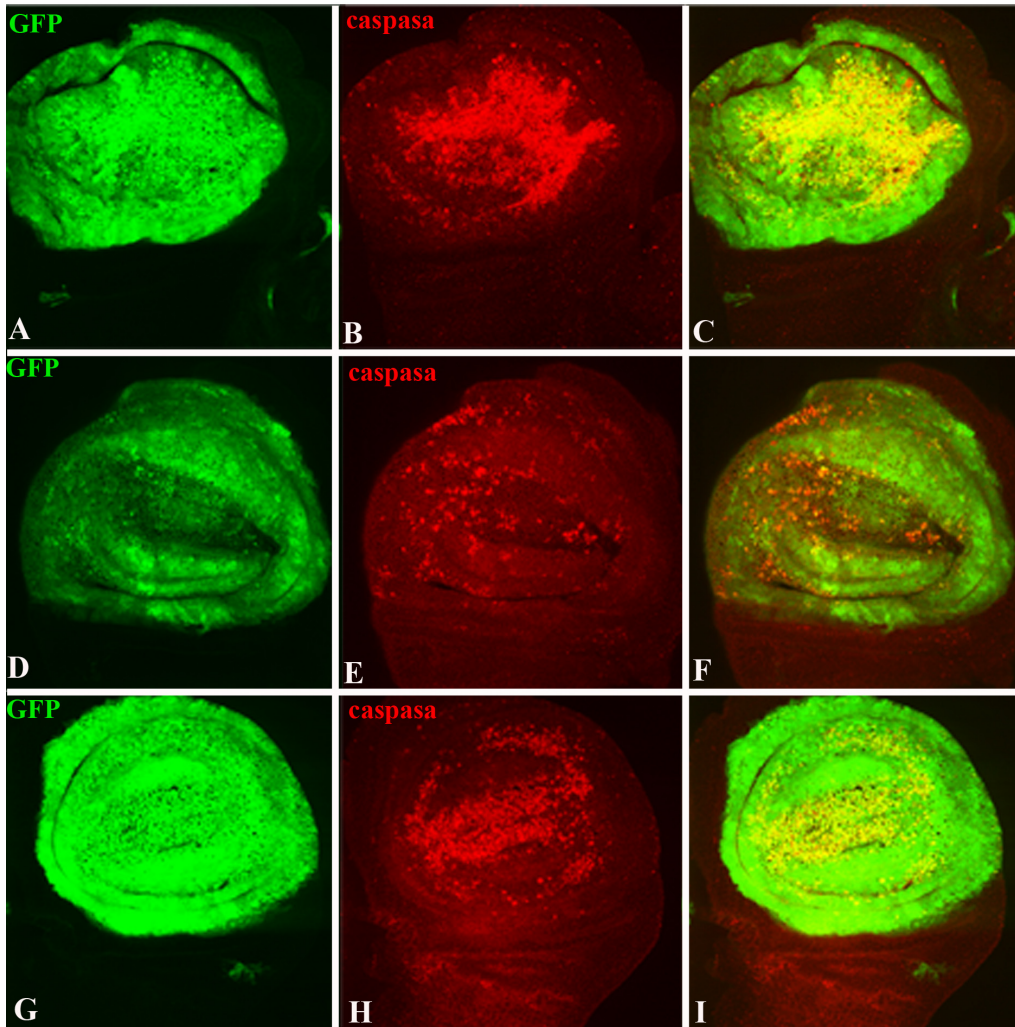


Figura 58. Efectos en la apoptosis debidos la sobre-expresión de dRYBP en ausencia y presencia de proteínas PcG y trxB. (A). Expresión de GFP (verde) en el disco de ala *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*, mostrando el dominio de expresión que dirige la línea nub-GAL4. (B) Expresión de caspasa-3 (rojo) en el disco de ala *UAS-dRYBP/nub-GAL4-UAS-GFP*. Se observa inducción de apoptosis en todo el dominio donde dRYBP se sobre-expresa. (C) Superposición de las imágenes A, B. (D) Expresión de GFP (verde) mostrando el dominio de expresión dirigido por la línea nub-GAL4. (E) Expresión de caspasa (rojo) en disco de ala *nub-GAL4/UAS-dRYBP; trxB²/+*. (F) Superposición de las imágenes. (G) Expresión de GFP (verde) mostrando el dominio de expresión dirigido por la línea nub-GAL4. (H) Expresión de caspasa (rojo) en disco de ala *nub-GAL4/UAS-dRYBP; Pc³/+*. (I) Superposición de las imágenes.

producido por la sobre-expresión en fondo silvestre, obteniéndose individuos con alas casi normales (Figura 59). Esto parece que se debe a una disminución de la apoptosis por la falta de una dosis de *trithorax*.

DISCUSIÓN

El gen *dRYBP* de *Drosophila*

El genoma de *Drosophila* contiene un solo gen *dRYBP* (CG12190, Flybase), localizado citológicamente en 58F, en el brazo derecho del cromosoma 2. Comprende 2,4 kb de ADN y da lugar a un solo transcrito (**Figura 28**) que codifica una proteína de 18 KD compuesta por un dominio N-terminal que contiene un Zn Finger del tipo C2-C2, cuya función molecular no parece ser la de unión a secuencias específicas de ADN, sino de intervenir en interacciones proteicas (Meyer y cols. 2000). El dominio C-terminal no tiene homología con ningún dominio funcional descrito hasta el momento.

dRYBP está conservado filogenéticamente y de hecho, el gen *RYBP*, fue inicialmente identificado en ratón mediante experimentos de doble-híbrido diseñados para la búsqueda de proteínas que interaccionaban con la proteína Ring1 de ratón (García y cols. 1999). Debido a su comportamiento como represor transcripcional en ensayos de transfección transitoria y a su interacción con componentes de la familia PcG, como YY1, Ring1 y M33 (PHO, SCE y PC en *Drosophila*) se ha propuesto que pertenece al grupo de proteínas PcG (García y cols. 1999). Miembros de la familia de *RYBP* incluyen al gen homólogo en humano *YAF1/DEDAF* y el gen *YAF2* de ratón y de humanos. Aunque son muy similares en su secuencia (**Figura 18**), mutaciones amorfas para *RYBP* en ratón (Pirity y cols. 2005) y para *YAF2* en pez cebra (Stanton y cols. 2006), son homocigóticas letales, indicando que la aparente redundancia funcional, debido a la homología de secuencia, no rescata la letalidad embrionaria. De la misma forma, sus productos parecen tener diferentes funciones tanto como reguladores transcripcionales del factor de transcripción *hGABP* (Sawa y cols. 2002) como reguladores de la apoptosis (Schickling y cols. 2001, Stanton y cols. 2006, Zheng y cols. 2001).

Expresión del gen *dRYBP*

Los resultados de esta Tesis muestran que la proteína *dRYBP* se expresa maternamente y a lo largo de todo el desarrollo de manera ubicua en todos los núcleos del embrión y de los discos imaginales (**Figura 19**). Este patrón ubicuo de expresión coincide con el del ARNm observado mediante hibridaciones “in situ” (Bejarano y cols. 2005), indicando que no existe una regulación post-transcripcional de su expresión. Mediante el uso de anticuerpos anti-*RYBP* de ratón, también se ha observado que la expresión es nuclear en células (García y cols. 1999) y nuclear y ubicua en el embrión (Pirity y cols. 2005). Sin embargo, en células humanas, usando la construcción *DEDAF-HA* para la detección de la proteína, se ha observado expresión de *RYBP/DEDAF* en el núcleo y en el citoplasma, siendo mayoritariamente nuclear (Zheng y cols. 2001). Quisimos comprobar la localización de la proteína *RYBP/DEDAF* en células humanas, células HeLa, usando el anticuerpo anti-*dRYBP* obtenido en este trabajo. Hemos observado (datos no mostrados) que el anticuerpo anti-*dRYBP* de *Drosophila* reconoce la proteína *RYBP/DEDAF* humana tanto en el núcleo como en el citoplasma. Aunque el anticuerpo anti-*dRYBP* de *Drosophila* parece ser bastante específico en la mosca, estos resultados podrían sugerir que quizás, el anticuerpo anti-*dRYBP* de *Drosophila* esté reconociendo otras proteínas en el citoplasma de las células HeLa, pero también podrían indicar que, de hecho *RYBP* se expresa en ambos compartimentos celulares en células humanas.

El patrón temporal y espacial de la expresión de *dRYBP* en *Drosophila* es similar a los patrones descritos para las proteínas PcG y *trxG*. Los altos niveles de expresión de los primeros estadios embrionarios coincide con el requerimiento materno de algunas de las proteínas del PcG (Simon 2003, Soto y cols. 1995). Además, muy importantemente, la expresión nuclear de *dRYBP* parece coincidir con la expresión subnuclear descrita para las proteínas PcG, ya que la expresión dentro del núcleo no es uniforme, sino que muestra más altos niveles en una región

concreta del núcleo y con un patrón punteado (**Figura 22**). Estos puntos no coinciden con la regiones de heterocromatina ni con el nucleolo (**Figuras 20 y 21**), sino que parecen coincidir con los “cuerpos Polycomb”, compartimento subnuclear donde se ha encontrado confinada la expresión de proteínas PcG (Buchenau y cols. 1998, Saurin y cols. 1998).

El descubrimiento de la existencia de un compartimento subnuclear, los denominados “cuerpos Polycomb”, donde se localizan estas proteínas, llevó a la proposición de que la represión mediada por las proteínas PcG incluye la compartimentalización de los genes sobre los que actúa (**Figura 11**). Este modelo propone que los genes diana se agrupan en dominios (Franke y cols. 1995, Orlando y Paro 1993) para una asociación local de genes reprimidos (Orlando y Paro 1995) o para una exclusión molecular de otras proteínas (Muller 1995) o para la exclusión del complejo de la ARN polimerasa (Bienz y Muller 1995, McCall y Bender 1996, Pirrotta 1995).

Los experimentos realizados en este trabajo para determinar si dRYBP co-localiza con las proteínas PC y PSC, localizadas en los “cuerpos Polycomb” (Buchenau y cols. 1998) no han dado resultados concluyentes, debido fundamentalmente a que todos estos anticuerpos están obtenidos en la misma especie y por tanto dificultando enormemente la distinción de las señales específicas de las proteínas. La proteína RYBP de ratón también presenta un patrón punteado en el núcleo (Arrigoni y cols. 2006, Garcia y cols. 1999), que puede que represente la expresión en los “cuerpos Polycomb” ya que colocaliza con la expresión de la proteína RING1A (SCE en *Drosophila*) que se ha demostrado localizarse en los “cuerpos Polycomb” (Schorlemmer y cols. 1997).

En embriones sincitiales, donde sucesivas mitosis sincronizadas tienen lugar rápidamente hasta la celularización, se observó una expresión dinámica durante la mitosis. La proteína dRYBP se disocia de la cromatina en profase, quedando visiblemente fuera de la cromatina en metafase, reasociándose en anafase y, estando totalmente unida a la cromatina en telofase (**Figura 23**). Este patrón de expresión dinámico de la proteína dRYBP coincide con los patrones de expresión de otras proteínas PcG, como la proteína PSC, PH y PC, aunque en estos tres casos no parece haber expresión durante la metafase (Buchenau y cols. 1998).

Función del gen *dRYBP*. Análisis de los fenotipos de falta de función

Se han estudiado los fenotipos asociados a la falta de función del gen *dRYBP* mediante el análisis de mutaciones en el gen y mediante la sobre-expresión del ARN interferente. Los resultados de esta trabajo de Tesis sugieren que *dRYBP* podría pertenecer al grupo de proteínas PcG/trxG, por lo que a continuación se discutirán nuestros resultados teniendo en cuenta las múltiples funciones descritas para estas proteínas (**Tabla 3**).

El estudio de la viabilidad de las mutaciones amorfas de *dRYBP* y de los fenotipos asociados a los mismos, muestra que la falta de función de *dRYBP* produce letalidad progresiva a lo largo del desarrollo y fenotipos con gran variabilidad en su penetrancia y expresividad. Por ejemplo, las divisiones nucleares en el sincitio embrionario pueden estar afectadas tan severamente como lo mostrado en la **Figura 30** (también DVD adjunto) o bien pueden ser completamente normales y esos embriones llegar a individuos adultos, que aunque siendo en su mayoría estériles, no muestran defectos morfológicos severos (**Figura 30**). De la misma forma, las larvas homocigóticas mutantes para *dRYBP* (**Figura 30**) o larvas en las que el ARNm se ha inactivado (**Figura 31**), pueden presentar tumores melanóticos, discos imaginales pequeños y defectos en la segmentación o bien en las mismas condiciones genéticas, pueden llegar a adultos. La letalidad progresiva durante el desarrollo y los fenotipos de los embriones y de las larvas se incrementa cuando el producto materno es eliminado mediante

la generación de clones en la línea germinal. Pero, sorprendentemente, se puede llegar a tener individuos adultos, en los que el producto materno y el producto zigótico han sido completamente eliminados.

¿A que se debe esta variabilidad? No es fácil explicar, con los conocimientos que tenemos hasta el momento, que individuos con el mismo genotipo y con la misma contribución materna se comporten de una forma tan diferente. La búsqueda de homólogos del gen *dRYBP* en el genoma de *Drosophila* indica que sólo existe un gen *dRYBP*, por lo que la variabilidad en la penetrancia y expresividad de los fenotipos no se puede explicar por la existencia de proteínas homólogas en secuencia. Quizás, podría explicarse por redundancia funcional, es decir la redundancia de factores implicados en los mismos procesos que *dRYBP* o bien a la plasticidad de los mecanismos en los que *dRYBP* participa, que depende de factores aún desconocidos. Un comportamiento similar se ha observado en mutaciones en el gen *posterior sex comb*, del grupo PcG (Martin y Adler 1993). Se ha descrito que mutaciones en genes del grupo *Polycomb* presentan fenotipos variables y dependientes de las condiciones de crecimiento de las moscas. Cuyas Quizás, un estudio más exhaustivo de la falta de función de genes de este tipo podría indicar similares comportamientos en genes descritos que intervienen en procesos epigenéticos en la mosca.

Mutaciones amorfas del gen *dRYBP* en ratón o del gen YAF-2 en pez cebra no presentan este comportamiento variable en la letalidad y expresividad/penetrancia de los fenotipos (Pirity y cols. 2005, Stanton y cols. 2006). Esto indica, como se ha mencionado anteriormente, que las proteínas homólogas no son capaces de rescatar la letalidad embrionaria, pero quizás sean capaces de rescatar la variabilidad.

El análisis de los fenotipos de los clones mutantes para *dRYBP* durante el desarrollo indican que *dRYBP* se requiere en todas los estadios del desarrollo. La observación de los fenotipos de falta de función indican que *dRYBP* participa, directa o indirectamente en una variedad de mecanismos como son: división nuclear, proliferación celular, respuesta inmune y/o hematopoyesis y/o tumorigénesis y control del mantenimiento de la expresión génica, entre otros, de los genes homeóticos. Estos tres mecanismos están implicados en una gran variedad de procesos biológicos, la participación de *dRYBP* y su requerimiento específico durante el desarrollo en los mismos están siendo en este momento estudiada en el laboratorio.

Los embriones tempranos de *Drosophila* (0-3 horas AEL) son un sistema muy conveniente para estudiar la mitosis. Las primeras 13 divisiones mitóticas son sincrónicas y muy rápidas debido a que las fases G1 y G2 están abreviadas y no existe citocinesis (Tram 2002). Los embriones *dRYBP*^{P[KG08683]}/*dRYBP*^{P[KG08683]} procedentes del cruce de machos y hembras *dRYBP*^{P[KG08683]}/*CyO* muestran defectos severos en la progresión de la mitosis (**Figura 30**). El mecanismo mediante el cual *dRYBP* interviene en el ciclo celular no ha sido estudiado, pero, si parece ser que el ciclo celular está enlentecido lo que daría cuenta del retraso en el desarrollo embrionario y larvario en los mutantes para *dRYBP*. Recientemente, se ha descrito que mutaciones en los genes *polyhomeotic*^{proximal}, *Enhancer of zeste*, *Polycomb*, *Additional sex comb* y *Posterior sex comb*, (O'Dor y cols. 2006) y (**Tabla 3**) muestran fenotipos similares a los anteriormente descritos, pero su papel en la regulación del ciclo no ha sido estudiada. *dRYBP* puede tener un papel directo o indirecto en la regulación del ciclo celular. Podría ser directo, como en el caso del gen *trithorax* del grupo trxB (Zhang y cols. 2005) o indirecto, como ha sido demostrado para otros genes del grupo PcG en mamíferos, ya que regulan la expresión de genes involucrados en mitosis (Jacobs y cols. 1999, Tetsu y cols. 1998),

Los discos imaginales de algunas de las larvas homocigóticas *dRYBP*^{P[KG08683]}/*dRYBP*^{P[KG08683]} son mas pequeños que los discos silvestres. De la misma forma, las alas adultas de moscas *UAS-RNAi_{RYBP} T2/en-GAL4*; *UAS-RNAi_{RYBP} T4/+* o *UAS-RNAi_{RYBP} T2/ci-GAL4*; *UAS-RNAi_{RYBP} T4/+* también parecen estar reducidas en su tamaño en los compartimentos afectados (**Figura 31**). Estos fenotipos no están relacionados con la activación de la apoptosis ya que no se ha ob-

servado activación de la caspasa 3 en estas condiciones. Experimentos de doble híbrido para la búsqueda de proteínas que interaccionan con E2F-6, un miembro de la familia de los factores de transcripción E2F que juegan papeles críticos en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (DeGregori y Johnson 2006) ha identificado la proteína RYBP (Trimarchi y cols. 2001). Se está actualmente estudiando las interacciones genéticas entre los genes de la familia E2F y *dRYBP* en *Drosophila*, lo que nos ayudaría a elucidar las vías por las que la falta de *dRYBP* produce efectos en la proliferación. Efectos en la proliferación de los discos imaginales también han sido descritos para mutaciones en genes PcG, como el gen *corto* (Kodjabachian y cols. 1998) (**Tabla 3**) y el gen *multi sex combs* (Santamaria y Randsholt 1995) cuyas interacciones con mutaciones *dRYBP* están siendo estudiadas.

Otro de los fenotipos asociados a la falta de función de *dRYBP* es la aparición de tumores melanóticos, que se distinguen por la presencia de cuerpos negros unidos a órganos internos tanto en las larvas como en los adultos (**Figura 30**). Estos tumores melanóticos comparten muchas características con las cápsulas que se forman alrededor de un parásito que contienen capas de lamelocitos melanizadas. La formación de las melanizaciones en *Drosophila* está asociado a la generación de tumores, generalmente no invasivos y en raros casos produciendo sobre-crecimientos. Se han descrito que mutaciones en aproximadamente 30 genes de *Drosophila*, producen la aparición de los mismos (para una revisión reciente ver (Lemaître y Hoffmann 2007, Minakhina y Steward 2006), entre los que se encuentran el gen *multi sex combs* (Docquier y cols. 1994) de la familia del grupo PcG. El sistema hematopoyetico de *Drosophila* lleva a cabo la respuesta inmune a través de la fagocitosis, la encapsulación y la melanización. La formación de las melanizaciones esta mediada por las vías del Factor nuclear kappa B (NF- κ B) que incluye en *Drosophila*, dos vías de señalización (**Figura 59**, para una revisión ver (Minakhina y Steward 2006): la vía de Toll/Dorsal y la vía de señalización de IMD/Relish (Immune Deficiency). No sabemos todavía como la proteína dRYBP actúa en estas vías de señalización, pero lo que si sabemos es que 1) la proteína dFADD (*Drosophila*, Factor Associated Death Domain, (**Figura 59**) participa en la respuesta inmune a través de la vía IMD (Naitza y cols. 2002) y 2) la proteína FADD de mamíferos interacciona, a través de su dominio DED (Death Effector Domain) con la proteína RYBP (Zheng y cols. 2001). Por lo tanto, bien podría ser el caso que dRYBP participara en el proceso de la respuesta inmune a través de la vía IMD. Las interacciones genéticas entre dFADD y dRYBP están siendo estudiadas, lo que nos ayudará a situar la proteína dRYBP en la vía de señalización adecuada. También, esta siendo estudiado si dRYBP esta directamente implicado en el proceso de hematopoyesis, como ha sido descrito para la proteína MSX del grupo PcG (**Tabla 3**). Aunque en mamíferos, varias de las proteínas PcG /trxG intervienen en el proceso de hematopoyesis (Lessard y Sauvageau 2003), por ahora, en *Drosophila*, solo el gen *msx* del grupo PcG y el gen *brama* del grupo trxG (**Tabla 2**) han sido implicados directamente en este proceso.

Las alas de las moscas $UAS-RNAi_{RYBP}^{T2/en-GAL4}$; $UAS-RNAi_{RYBP}^{T4/+}$ o $UAS-RNAi_{RYBP}^{T2/ci-GAL4}$; $UAS-RNAi_{RYBP}^{T4/+}$ presentan con alta penetrancia y expresividad la aparición de ampollas, fenotipo debido a la aposición incorrecta entre las superficies dorsales y ventrales durante el proceso de maduración del ala (**Figura 31**). Este fenotipo también se observa, aunque con menos penetrancia en las moscas mosaico y en las moscas homocigóticas mutantes para *dRYBP*. La incorrecta expansión del ala, así como la incorrecta aposición entre las superficies dorsales y ventrales de la misma, puede ser debido a muchos factores involucrados en la formación del patrón del ala. Sin embargo, también se ha descrito que los hemocitos son esenciales en el proceso de la maduración del ala (Kiger y cols. 2001) y la falta de los mismos produce fenotipos en los que las alas o bien no se extienden o bien la aposición de las superficies dorsales/ventrales está afectada. Teniendo en cuenta la aparición de tumores melanóticos en las mutaciones para *dRYBP*, parece razonable pensar que el fenotipo en el ala esta también relacionando con fallos en las vías hematopoyéticas debido a la falta de *dRYBP*.

Finalmente, nuestros resultados genéticos y moleculares indican que dRYBP interacciona con proteínas Polycomb y con proteínas trithorax. Las interacciones moleculares que hemos probado mediante ensayos de inmunoprecipitación y de “pull down” muestran que la proteína dRYBP interacciona con las proteínas SCE y PHO. En ensayos de doble híbrido, se mostró que RYBP murino interacciona con RING 1, YY1 y M33 (SCE, YY1 y PC respectivamente en *Drosophila* (García y cols. 1999). Hemos estudiado si la expresión de las proteínas homeóticas estaba afectada en embriones homocigóticos mutantes para dRYBP y no hemos encontrado efectos en las mismas. Este resultado está de acuerdo con la observación de que los embriones que llegan a formar cutícula no presentan transformaciones homeóticas típicas de la falta de función en genes PcG o trxG (**Figura 31**), aunque sí presentan fenotipos asociados con genes implicados en la formación de patrón. Varias son las observaciones que podrían explicar que la falta de función de *dRYBP* no presente fenotipos típicamente homeóticos y por lo tanto la expresión de los mismos no esté afectada. Primero, la falta de función de *dRYBP*, al igual que ocurre con la falta de función de otros genes del grupo PcG, como *corto* (López y cols. 2001) o *cramped* (Yamamoto y cols. 1997) no producen, por sí mismas, ni fenotipos homeóticos evidentes ni des-represión de la expresión de los genes homeóticos. Segundo, hemos demostrado que mutaciones en el gen *dRYBP* incrementan el fenotipo haplo-insuficiente de la mutación *trx^{E2}* e incrementa y suprime los efectos fenotípicos haplo-insuficientes de la mutación *Sce¹* (**Figura 33**). Estos resultados sugieren que *dRYBP* se comporta genéticamente como un gen del grupo ETP (Enhancer of Trithorax and Polycomb) (Gildea y cols. 2000), por lo que quizás, la falta de des-represión de las proteínas homeóticas no se observa debido a que en ausencia de *dRYBP* ambos mecanismos de mantenimiento de la represión y de la activación están afectados y por tanto sus efectos fenotípicos se compensarían siendo muy difícil de detectar. En este momento, y en vista de que mutaciones amorfas para *dRYBP* interaccionan con mutaciones del grupo PcG y trxG (**Figura 33**) estamos estudiando la expresión de las proteínas homeóticas en embriones homocigóticos mutantes tanto para *dRYBP* y para genes PcG y trxG.

Los estudios de interacciones genéticas indican que *dRYBP* solo interacciona con *Sex comb extra* y con *trithorax*, pero sorprendentemente, y a pesar de las interacciones moleculares descritas con la proteína Polycomb, no hemos encontrado interacciones génicas con *Polycomb*. Se está realizando un análisis más exhaustivo de interacciones con otros genes del grupo PcG, como *pleihomeotic*, además de con dobles o triples combinaciones mutantes en genes del grupo PcG/trxG para poder obtener resultados más concluyentes.

En resumen, el análisis de los fenotipos de la falta de función del gen *dRYBP* revela que su función se requiere en varios procesos biológicos de la mosca. Si este requerimiento es directo o indirecto aún no está clarificado. Bien podría ser que el papel de *dRYBP* en estos procesos fuera indirecto debido a que su función fuera mantener la expresión génica de factores involucrados en este proceso o directa como ha sido demostrado en otros genes del grupo PcG.

Actividad transcripcional de la proteína dRYBP

Los resultados de este trabajo muestran que cuando la proteína dRYBP-GAL4DB está unida a secuencias de ADN, es capaz de reprimir, durante todo el desarrollo, la transcripción de minigenes marcadores que contienen secuencias del BX-C (**Figuras 35 y 36**). Además, este silenciamiento es dependiente de al menos tres proteínas del grupo PcG: PC, SCE y PHO indicando que la represión se ejerce mediante la interacción con los complejos proteicos formados por proteínas PcG. El hecho de que la represión sea dependiente de PHO, la única proteína PcG con actividad de unión a ADN de una forma específica de secuencia, revela que PHO debe de tener otras funciones además de la de reclutar los complejos PcG al ADN.

Otros resultados de éste trabajo también indican que dRYBP actúa como un represor transcripcional. Primero, la proteína GALDB-dRYBP es capaz de reprimir la expresión del gen *white* incluido en las construcciones como marcadores de transformación (**Figura 36**). Segundo, el silenciamiento mediado por el elemento MCP138 del gen *Abd-B* se pierde en discos imaginales de larvas heterocigóticas para la *Df(2R)X58-8*, que descubre, entre otros, el gen *dRYBP* (**Figura 37**). Tercero, altos niveles de dRYBP reprimen, dependiente de proteínas PcG, la expresión de UBX (**Figura 39**) y generan fenotipos indicativos de represión del gen *engrailed* (**Figura 40**).

Todos estos resultados indican que la proteína dRYBP tiene actividad de represor transcripcional dependiente de proteínas PcG, indicando que *dRYBP* actúa como un gen PcG en *Drosophila*.

Función del gen *dRYBP*. Análisis de los fenotipos producidos por la sobre-expresión de dRYBP

Los resultados de los experimentos de sobre-expresión de dRYBP mediante el sistema GAL4/UAS, en los tejidos imaginales muestran que altos niveles de dRYBP generan fenotipos homeóticos (**Figuras 38, 39 y 40**). Este trabajo ha demostrado, como se discutirá mas adelante, que estos fenotipos son parcialmente debidos a la activación de la apoptosis debida a la sobre-expresión de dRYBP. El mecanismo por el cual se generan estos fenotipos es por el momento desconocido. Nuestra hipótesis es que altos niveles de la proteína dRYBP, que interacciona con proteínas Polycomb y trithorax, son capaces de “secuestrar” los complejos multi-proteicos y por tanto generar fenotipos equivalentes a los de falta de función producidos por mutaciones de genes PcG y *trxG* como se discutirá a continuación.

En el disco imaginal de ala *sdGAL4/UASdRYBP*, se observa expresión de la proteína UBX (**Figura 40**) con el mismo patrón que se observa en mutaciones heterocigóticas para genes del grupo PcG. Esta similitud de fenotipos sugiere que la proteína dRYBP podría estar reclutando los complejos PcG y por tanto producir un fenotipo similar a la falta de una dosis del gen *Polycomb* (**Figura 40**). La expresión de UBX en discos de ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP; Pc³/+* simularía una situación hipotética (las mutaciones homocigóticas para *Polycomb* son letales) en la que la expresión de Polycomb, en condiciones heterocigóticas estaría más reducida y por lo tanto la des-represión de UBX se extendería a un mayor numero de células como se observa (**Figura 40**) produciendo un fenotipo mas fuerte de transformación de ala en halterio, como también se observa (**Figura 40**). Este incremento en el fenotipo no es debido al incremento de apoptosis ya que en discos imaginales de ala *sd-GAL4/UAS-dRYBP; Pc³/+* la apoptosis no se altera (**Figura 58**). En el caso de *sd-GAL4/UAS-dRYBP; pho¹/+* la des-represión de UBX se incrementa, aunque no tanto como en condiciones heterocigóticas mutantes para *Polycomb*. La hipótesis de que, en estas condiciones (*pho¹/+*), la activación de la apoptosis se vea incrementada esta siendo actualmente estudiada en el laboratorio. Por último, la haplo-insuficiencia del gen *trithorax* rescata, casi por completo, el fenotipo producido por los altos niveles de dRYBP (**Figura 40**) seguramente mediado por el rescate de la apoptosis inducida por dRYBP (**Figura 58**). La haplo-insuficiencia del gen *trithorax* no produce des-represión de UBX ni efectos en la morfología del ala (Ingham 1985). Por tanto el fenotipo de las alas *sd-GAL4/UAS-dRYBP; trx^{E2}/+* podrían estar reflejando la falta de función de *trithorax*. Los efectos en la venación observados en la **Figura 40** son similares a los efectos en la venación del ala descritos en clones mutantes homocigóticos para *trithorax* (Ingham 1985).

De la misma forma, la sobre-expresión de dRYBP con la línea *en-GAL4* en el disco de ala, (*en-GAL4/UAS-dRYBP* **Figura 40**) produce, además de fenotipos indicativos de la represión del gen *engrailed*, fenotipos indicativos de “secuestro” de complejos PcG debido a la parcial

transformación de ala en halterio y de “secuestro” de complejos *trxG* indicado por la aparición de tejido de ala en el húmero. Este fenotipo se ha observado en mutaciones para el gen *trithorax* (Ingham 1981), pero no se observa cuando se inducen clones mutantes *trithorax* durante el desarrollo (Ingham 1985) indicando que estas transformaciones se deben a la falta de *trithorax* en estadios muy tempranos en el desarrollo, y por tanto sugiriendo que el hipotético “secuestro” de los complejos mediado por dRYBP tiene lugar desde muy temprano en el desarrollo.

En el disco imaginal de pata, los altos niveles de proteína dRYBP produce la aparición de peines sexuales en la pata meso-torácica y en la pata meta-torácica de la mosca adulta así como la des-represión de la proteína *Sex comb reduced* (**Figura 44**). En este caso, la sobre-expresión de dRYBP produciría el “secuestro” de los complejos PcG originando fenotipos similares a su falta de función.

En el disco de halterio, altos niveles de dRYBP produce represión del gen *UBX* (**Figuras 39**) y el halterio está parcialmente transformado hacia ala (fenotipo de “halterio peludo”), pero sorprendentemente no cambia de tamaño, e incluso es mas pequeño. Siguiendo con la hipótesis de que altos niveles de dRYBP secuestran complejos PcG/*trxG*, la represión de *UBX* se explicaría por secuestro de complejos *trxG* y por tanto aparición de fenotipos indicativos de transformación de halterio a ala, lo que ocurre en mutaciones para los genes del grupo *trxG*. Sin embargo, no entendemos porqué el halterio se transforma parcialmente hacia ala, pero sin embargo no crece. Los resultados indican, que la falta de crecimiento no es dependiente de la apoptosis inducida por altos niveles de dRYBP (**Figuras 45**) ya que, el fenotipo de “halterio peludo” se sigue observando en moscas *UAS-dRYBP/+; Ubx-GAL4/UAS-p35* (datos no mostrados), donde la apoptosis se reprime mediante la sobre-expresión de p35. Recientemente, se ha descrito que el tamaño del halterio, y lo que le hace diferente al ala, es dependiente de los niveles conjuntos de *DPP* (*Decapentaplegic* St Johnston y cols., 1990) y de *UBX* (de Navas y cols. 2006). Quizás, altos niveles de la proteína dRYBP, además de afectar los niveles de *UBX* afecta los niveles de *DPP*, hipótesis que se está comprobando actualmente.

Por último, el mismo comportamiento se observó cuando se estudió el efecto de altos niveles de dRYBP en el mantenimiento del silenciamiento mediado por el elemento MCP138 (Busturia y cols. 2001). Altos niveles de dRYBP producen la des-represión de la *lacZ* (**Figura 37**) en los embriones y en los discos imaginales, probablemente debido al secuestro de los complejos PcG/*trxG* mimetizando la pérdida de silenciamiento observada en discos imaginales de larvas *P[PBXMCP138]/Pc³* (Busturia y cols. 2001).

Todos estos resultados de sobre-expresión de dRYBP, nos indican que dRYBP parece ser capaz de interactuar con proteínas PcG y *trxG* y reclutarlas.

Función de los dominios de la proteína dRYBP

Para el estudio de la función los dominios de la proteína dRYBP se generaron proteínas mutantes y se estudio el fenotipo producido en experimentos de sobre-expresión mediante el sistema GAL4/UAS.

La sobre-expresión de la proteína dRYBP-ZF_{mut} (**Figura 53**) no produce fenotipos ni en el ala ni en el halterio. Los discos ala y halterio de larvas *nubGAL4/UAS dRYBP-ZF_{mut}* no presentan alteraciones en la expresión *UBX* y además, no presentan activación ectópica de la apoptosis. La proteína dRYBP en los discos *nub-GAL4/UAS-dRYBP-ZF_{mut}* se expresa en el núcleo. Estos resultados indican que o bien la integridad del Zn Finger es necesaria para la generación de los fenotipos mediados por la sobre-expresión de dRYBP, o bien que la proteína no es funcional, probablemente debido a impedimentos estéricos que le impiden adquirir la conformación adecuada para ser funcional. Por tanto no podemos concluir sobre el papel del Zn Finger en

la función de la proteína mediante el uso de esta construcción.

La sobre-expresión de la proteína dRYBP- ΔC_r tampoco produce fenotipos ni en el ala ni en el halterio. Además, aunque una débil señal difusa se observa por toda la célula, el anticuerpo anti-dRYBP no parece ser capaz de reconocer esta proteína mutante. Estos resultados no nos sirven para concluir sobre la funcionalidad de esta proteína truncada. Estudios de función de la proteína humana RYBP/DEDAF indican que la proteína truncada que pierde el C-terminal también pierde la expresión nuclear (Zheng y cols. 2001).

La sobre-expresión de la proteína dRYBP- ΔZF (*sdGAL4/UASdRYBP- ΔZF*) produce fenotipos en las alas y en los halterios (**Figuras 54 y 56**) muy similares a los que se observan en las moscas en las que se sobre-expresa dRYBP. También, la expresión de UBX se des-reprime en el disco de ala y se reprime en el disco de halterio de una forma muy similar a los discos de larvas *sd-GAL4/+; UAS- dRYBP*. Curiosamente, aunque en el dominio N-terminal no existen secuencias de localización nuclear, la expresión de dRYBP en los discos de ala *sdGAL4/UASdRYBP- ΔZF* no es nuclear (**Figuras 54 y 56**) y los discos de ala y halterio de larvas *sdGAL4/UASdRYBP- ΔZF* no presentan activación de la apoptosis (**Figura 55**). Estos resultados indican que en el dominio N-terminal, donde se localiza el Zn-Finger, no interviene en la generación de los fenotipos observados por la sobre-expresión de dRYBP. Además, estos resultados también indican que la activación de la apoptosis requiere o bien que la proteína se encuentre localizada en el núcleo o bien la interacción del dominio N-terminal con las proteínas involucradas en la generación de la apoptosis mediada por altos niveles de dRYBP. Si como se ha hipotetizado anteriormente, los fenotipos de sobre-expresión de dRYBP podrían explicarse por el secuestro de las proteínas PcG/trxG, el hecho de que la proteína dRYBP- ΔZF produzca los mismos fenotipos indica que el hipotético "secuestro" tiene lugar a cabo mediante la interacción con el dominio C-terminal de la proteína dRYBP.

Interesantemente en la mutación *dRYBP ^{$\Delta 55$}* obtenida en este trabajo (**Figura 28**), que delecciona el Zn Finger, la expresión de la proteína dRYBP es nuclear (datos no mostrados). No tenemos explicación a la diferencias de localización observadas en células de dRYBP- ΔZF y *dRYBP ^{$\Delta 55$}* salvo, obviamente, que estas diferencias se deben a que las mutaciones no son idénticas. Se ha descrito que la expresión de la proteína RYBP murina en el mutante que delecciona el Zn Finger es nuclear mostrando patrón de puntos, aunque este patrón es ligeramente diferente ya que hay menos puntos discretos y están agregados entre ellos (Arrigoni y cols. 2006). Interesantemente, se ha descrito muy recientemente que el dominio Zn Finger de la proteína RYBP murina es ubiquitinizado por la proteína RING1B (SCE en *Drosophila*) y que esto sería esencial para la función de RYBP (Arrigoni y cols. 2006). Un estudio mas detallado de los fenotipos asociado a moscas homocigóticas *dRYBP ^{$\Delta 55$}* se esta llevando a cabo en este momento en el laboratorio para poder concluir sobre la funcionalidad del dominio deleccionado en *dRYBP ^{$\Delta 55$}* .

Función del gen *dRYBP* en la apoptosis en *Drosophila*

La falta de función de *dRYBP* en *Drosophila* no parece producir activación o represión de la apoptosis, ya que embriones *dRYBP* homocigóticos mutantes no presentan alteración en los patrones de expresión de caspasa 3 ni alteraciones en la tinción de Naranja de Acridina (datos no mostrados). Una leve y variable disminución de la apoptosis ha sido descrita en ratones deficientes de RYBP (Pirity y cols. 2005). Sin embargo, la falta de función de YAF2 en pez cebra, produce una fuerte inducción de la apoptosis mediada por la caspasa 8 (Stanton y cols. 2006).

La muerte celular apoptótica es necesaria durante el desarrollo y la vida de los organismos para la eliminación de células innecesarias, células infectadas o células dañadas. En los me-

canismos apoptóticos, las caspasas iniciadoras y efectoras juegan un papel central en la maquinaria de muerte celular por lo que es fundamental una precisa regulación de su expresión (Hay y Guo 2006). Señales extrínsecas, tales como ligandos (TNFs, Tumor Necrosis Factors) se asocian a TNFRs (Tumor Necrosis Factor Receptors), activan las caspasas iniciadoras, que a su vez activan las caspasas efectoras y desencadenan la apoptosis (**Figura 59**). También, la activación de los genes pro-apoptóticos (RHG) regulan la actividad de las caspasas impidiendo que las proteínas Inhibidoras de la apoptosis (DIAP) ejerzan su represión sobre las caspasas iniciadoras y efectoras (Hay y cols. 2004).

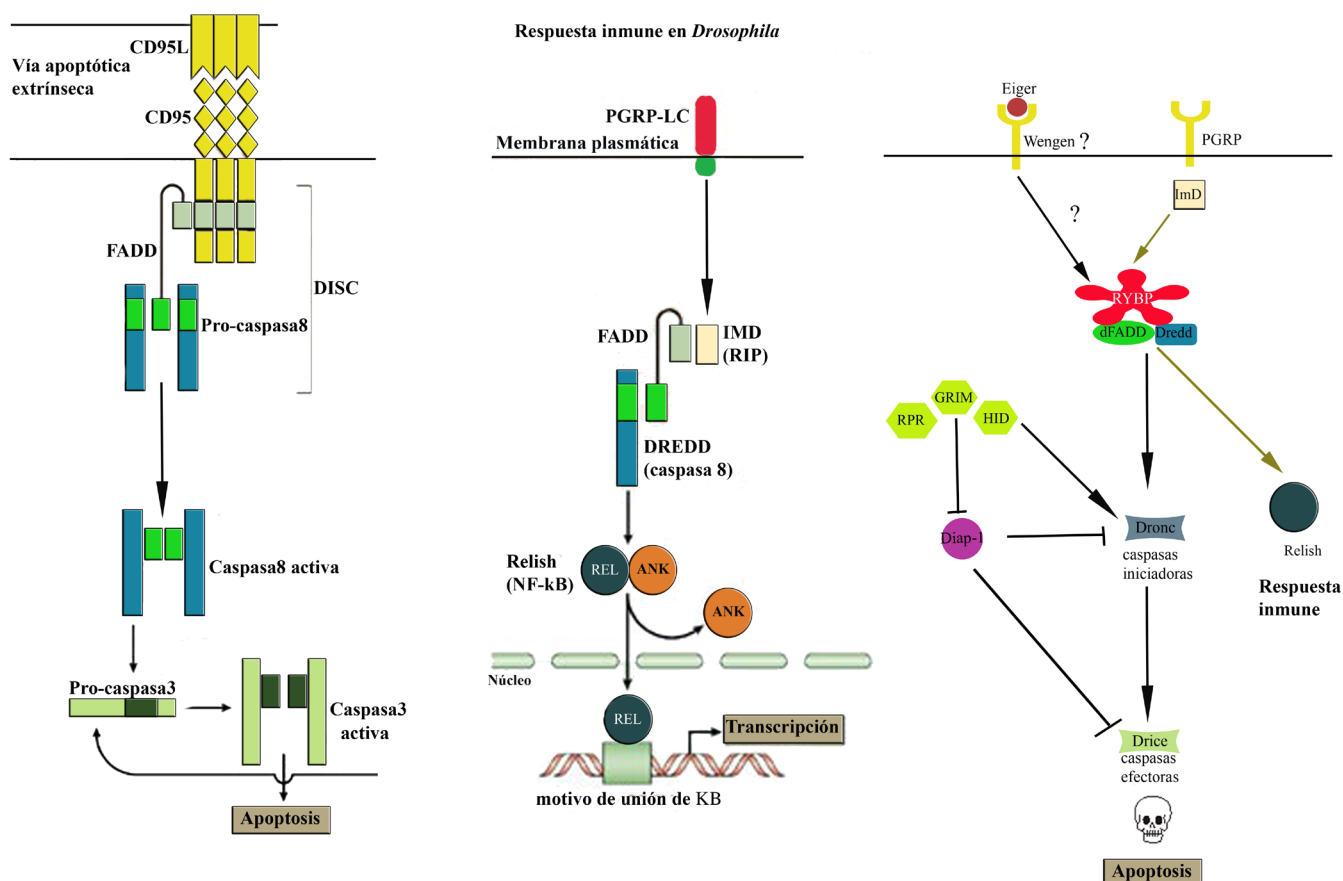


Figura 59. ¿Conecta dRYBP la vía apoptótica y la vía de respuesta inmune en *Drosophila*? Vía de la apoptosis extrínseca en mamíferos. CD95R es uno de los receptores que inicia la vía extrínseca mediante la unión a su ligando CD95L. La caspasa iniciadora, pro-caspasa-8, uniéndose a FADD y formando el complejo DISC se activa y activa a la caspasa efectora, caspasa-3, induciendo la apoptosis. **Respuesta inmune en *Drosophila*.** La respuesta inmune se activa cuando componentes de la pared bacteriana son reconocidos por el receptor PGRP-LC. La activación del receptor inicia una cascada de señalización a través de IMD. FADD se une a la caspasa DREDD promoviendo la activación de ésta que, una vez activa libera a RELISH para su translocación al núcleo, lo que promueve la transcripción de genes que codifican péptidos bacterianos. **Función hipotética de la proteína dRYBP.** dRYBP produce la oligomerización entre FADD y DREDD en respuesta bien a señales extrínsecas apoptóticas, vía Eiger, o infección por bacterias Gram-negativas. Esto produce el procesamiento de DREDD que promueva la activación de las caspasas o de relish. En el proceso apoptótico intervienen los genes pro-apoptóticos Rpr, Hid y Grim (RHG), los cuales son inhibidos por la DIAPs, las cuales inhiben las caspasas.

El procesamiento de las caspasas de su estado pro-caspasa inactiva a caspasa activa se realiza mediante proteólisis. La activación del procesamiento de las caspasas iniciadoras se lleva a cabo mediante la oligomerización, a través de interacciones proteicas mediadas por los dominios DED (Death effector domains) o CARD (caspase effector domain) que contienen las pro-caspasas. Este proceso, está muy bien estudiado en humanos, sin embargo en *Drosophila* aún no se sabe si los homólogos a proteínas involucradas en este proceso, funcionan de la misma forma. Así, por ejemplo (**Figura 59**), los TNRF en humanos (CD95/TNFRSF6/FAS) y los TNFs

contienen el DD (Death Domain), que puede reclutar la pro-caspasa 8 (que contiene un dominio DED- Death Efector Domain) a través de la proteína FADD (FAS-associated Death Domain and DED-containing protein) y se induce la formación del DISC (Death –inducing signalling complex) para producir la caspasa 8 activa en respuesta a la señal extrínseca (Siegel 2006).

Se ha descrito que la proteína RYBP/DEDAF interacciona con varias proteínas que contienen el dominio DED, como son FADD, pro-caspasa-8 (dFADD, DREDD respectivamente en *Drosophila*), pro-caspasa 10 y DEDD (DED-containing DNA-binding protein) de estas dos últimas no se ha descrito ningún homólogo en *Drosophila* por el momento. Además, también se ha observado, que altos niveles de RYBP/DEDAF en células de mamíferos aumenta la apoptosis mediada por los TNFRs (Zheng y cols. 2001).

Nuestros resultados indican que altos niveles de dRYBP producen una fuerte activación de la apoptosis en el ala y en el halterio de *Drosophila*, y curiosamente en ninguno de los otros discos imaginales estudiados. La apoptosis mediada por dRYBP es dependiente de caspasas, ya que se inhibe con la sobre-expresión de p35 (**Figuras 45 y 47**), con altos niveles de DIAP (**Figura 49**), y disminuye en ausencia de una dosis de los genes RHG (**Figura 50**). Debido a las observadas interacciones de RYBP con las proteínas FADD y caspasa-8 (Zheng y cols. 2001), decidimos estudiar si la inducción de la apoptosis mediada por altos niveles de dRYBP era también dependiente de estos factores en *Drosophila*. Los resultados indican que en ausencia de dFADD y de DREDD (**Figuras 51 y 52**) no tiene lugar la apoptosis. Por ultimo, la apoptosis mediada por altos niveles de dRYBP no se produce a través de la vía JNK.

Los mecanismos por los que altos niveles de dRYBP produce apoptosis en el ala y en el halterio están siendo estudiados en el laboratorio. En el ala y en el halterio, altos niveles de dRYBP producen tanto apoptosis y des-represión de UBX en el ala y represión de UBX en el halterio. Se pensó que la inducción de apoptosis y el efecto en la expresión de UBX podrían estar relacionados. Sin embargo, discos imaginales donde la apoptosis se inhibe (**Figuras 45, 47 y 49**) mediante la sobre-expresión de p35 o de DIAP presenta des-represión de UBX en el ala y represión de UBX en el halterio. De la misma forma, la sobre-expresión de la proteína mutante dRYBP-ΔZF produce sobre-expresión de UBX, pero sin embargo la apoptosis no tiene lugar (**Figura 55**). Estas dos observaciones indican que la alteración de la expresión de UBX puede tener lugar en ausencia de la activación de la apoptosis.

La ausencia de apoptosis en mutaciones para *dFADD* y *dredd*, así como las observaciones de que DEDAF/RYPB promueve la oligomerización de esas proteínas (Zheng y cols. 2001) podría sugerir que cantidades elevadas de la proteína dRYBP induce la formación de los complejos dFADD/DREDD de forma que se produce más cantidad de caspasa-8 (DREDD) activa y la consecuente inducción de la apoptosis. Además, nuestros resultados también indican que la apoptosis es o bien dependiente del dominio N-terminal de dRYBP, o bien dependiente de la expresión de la proteína dRYBP en el núcleo, donde se ha encontrado interacción de RYBP con DEDD (DED-containing DNA-binding protein).

Discos de ala mutantes para *dRYBP* no parecen presentar patrones apoptóticos aberrantes. De la misma forma que discos de ala mutantes para *dFADD* (datos no mostrados) y discos mutantes para *dredd* (Georgel y cols. 2001, Naitza y cols. 2002). Estas observaciones podrían indicar que 1) Ninguno de estos factores interviene en las vías de apoptosis normal que tiene lugar durante el desarrollo, 2) Que existen otros factores redundantes que dan cuenta de la falta de fenotipos apoptóticos 3) Que es necesario eliminar los tres factores, dRYBP, dFADD y DREDD para impedir totalmente el procesamiento de la pro-caspasa 8, ya que estos tres factores interaccionan a través de los dominios DED para su procesamiento 4) Que el requerimiento de estos factores solo tenga lugar en respuesta a una determinado “contexto” celular.

Se ha observado, que altos niveles de RYBP/DEDAF en células de mamíferos aumenta la apoptosis mediada por los TNFRs (Zheng y cols. 2001). Además, la sobre-expresión de RYBP

solo produce apoptosis en células tumorales (Danen-van Oorschot y cols. 2004, Noteborn 2005, Rohn y Noteborn 2004). Además se ha descrito que la proteína RYBP interacciona con la proteína Apoptina, la cual únicamente produce apoptosis en células tumorales (Danen-van Oorschot y cols. 2004). Por el momento no entendemos la razón por la cual dRYBP solo produce apoptosis en los discos de ala y de halterio, ya que todos los factores involucrados en las vías apoptóticas conocidas en *Drosophila* se expresan ubicuamente. El estudio detallado de este proceso nos ayudara a elucidar la existencia de un mecanismo extrínseco que solo se pone de manifiesto en determinados contextos celulares, de la misma forma que ocurre con la respuesta inmune donde también interviene estos tres factores (**Figura 59**).

Función de las proteínas de los grupos PcG y trxG en la apoptosis

Es cada vez más patente que proteínas que controlan la organización de la cromatina juegan un papel fundamental en la patogénesis del cáncer (Sparmann y van Lohuizen 2006) y de otras enfermedades donde la activación o la represión de los mecanismos apoptóticos es crucial para el desarrollo de las mismas (Felix y cols. 1993). En mamíferos, el papel de los reguladores epigenéticos PcG y trxG en los mecanismos de apoptosis esta siendo intensamente estudiado, ya que se ha demostrado que estas proteínas intervienen en la tumorigénesis mediante, por ejemplo, la represión de los genes supresores de tumores, que normalmente funcionan restringiendo la proliferación incontrolada a través de la activación de la apoptosis. Por ejemplo, la proteína BMI (PSC en *Drosophila*, **Tabla 1**) es capaz de inhibir la apoptosis inducida por c-Myc (Jacobs y cols. 1999).

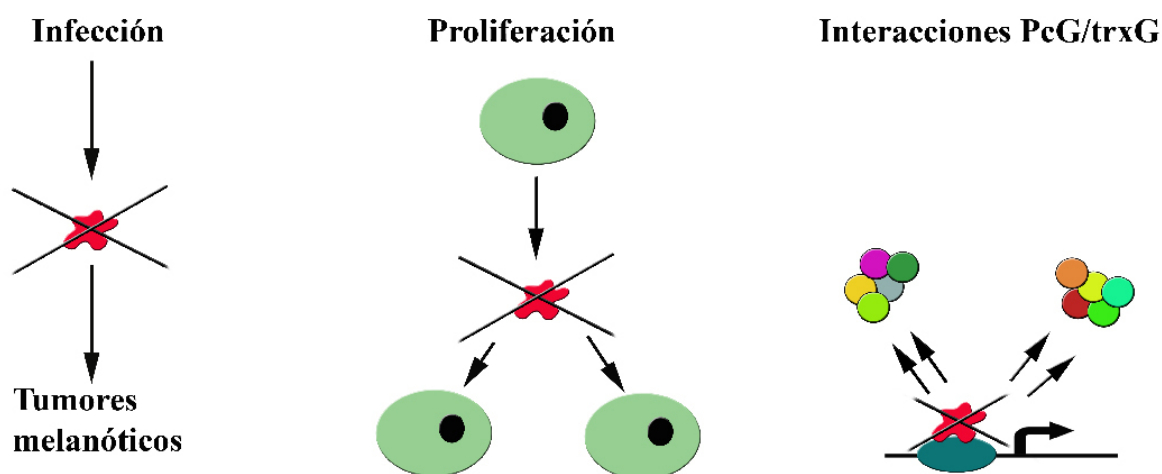
Poco se sabe de la implicación de los genes PcG y trxG en los mecanismos apoptóticos de *Drosophila*. Nuestros resultados indican que la apoptosis mediada por altos niveles de dRYBP es fuertemente disminuida en ausencia de una dosis del gen *trithorax* (**Figura 58**). Sin embargo, no se ve afectada por la haplo-insuficiencia del gen *Polycomb* (**Figura 58**). Este resultado sugiere que en el mecanismo de activación de la apoptosis dependiente de altas cantidades de proteína dRYBP, la proteína Trithorax, pero no Polycomb, está involucrada, y quizás, sugiere que *trithorax* tiene un papel en las vías apoptóticas en *Drosophila*.

Para empezar a esclarecer el papel de las proteínas epigenéticas en la apoptosis en *Drosophila* estudiamos si la sobre-expresión de estas proteínas tenían, al igual que dRYBP, la capacidad de activar la apoptosis. De las tres proteínas investigadas Polycomb, Sex comb extra y trithorax, solo ésta última (**Figura 58**) activa la apoptosis. No sabemos cuales son los mecanismos por los que altos niveles de la proteína TRX inducen la activación de la vía apoptótica y ni como bajos niveles de la proteína trithorax disminuyen la activación de la apoptosis inducida por dRYBP.

¿Qué cualifica a una proteína para ser clasificada como una proteína PcG/trxG?

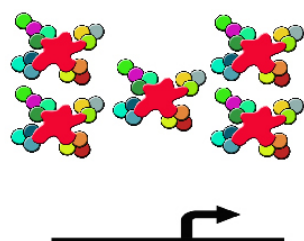
Tradicionalmente, la clasificación de una proteína en el grupo de las proteínas PcG /trxG requería que mutaciones en el gen produjeran fenotipos típicamente homeóticos (mas frecuentemente la aparición o desaparición de los peines sexuales en las patas). Cuando los anticuerpos para las proteínas homeóticas estuvieron disponibles para la comunidad científica, pasó a ser necesario que mutaciones en el gen a clasificar, produjeran o bien des-represión o bien inactivación de la expresión de las proteínas homeóticas. Más aún, al descubrir que las

Bajos niveles de dRYBP

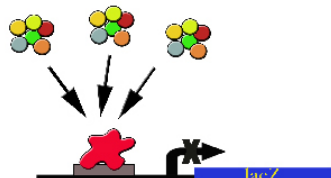


Altos niveles de dRYBP

Secuestro de complejos PcG/trxG



Represión transcripcional dependiente de PcG



Apoptosis

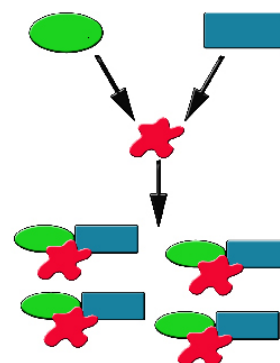


Figura 60. Esquema resumen de la función de dRYBP. En el panel superior se muestra lo que ocurre cuando los niveles de dRYBP son bajos: Aparición de tumores melanóticos, problemas en la mitosis, aumento de los fenotipos Polycomb y trithorax. En el panel inferior se muestra lo que ocurre cuando los niveles de dRYBP son altos: secuestro de proteínas PcG y trxG, apoptosis.

proteínas PcG/trxG se unen a sitios comunes y no comunes en los cromosomas politénicos, demostrar que, el gen en cuestión, estaba implicado en el mecanismo de mantenimiento de la actividad transcripcional de los genes diana pasó a ser un requerimiento.

La obtención de mutaciones y el estudio de expresión eran relativamente fáciles de realizar en *Drosophila*. Sin embargo, a medida que los homólogos de las proteínas PcG/trxG fueron descubiertos en otros organismos, como el ratón, donde los genes están frecuentemente duplicados y donde la obtención de mutaciones no es tan factible como en la mosca, los requerimientos para la clasificación de proteínas PcG/trxG volvieron a “evolucionar”. En ese momento, en ratón, la homología de secuencia y las interacciones proteicas llegaban a ser suficientes para la inclusión de una proteína en el grupo PcG/trxG. ¿Significa esto, que a

medida que se enriquecen nuestros conocimientos sobre las proteínas PcG y trxG no solo en *Drosophila* sino en otros sistemas experimentales, los requerimientos son más numerosos? o ¿Significa que, quizás, no todas las proteínas PcG/trxG tienen que presentar las mismas propiedades?

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis creemos califican al gen *dRYBP* como un gen del grupo PcG/trxG (**Figura 60**) ya que cumple los siguientes requerimientos: 1) Las mutaciones de falta de función del gen *dRYBP* interaccionan con mutaciones en los genes del grupo PcG y trxG, lo que sugiere que *dRYBP* pueda ser, por el momento clasificado como un gen ETP (Enhancers of Polycomb y trithorax). 2) La falta de función no presenta clásicos fenotipos homeóticos, pero sin embargo muestra fenotipos similares a los producidos por mutaciones en otros genes PcG. 3) El análisis de la actividad transcripcional de la proteína dRYBP indica que funciona como un represor transcripcional y que esta función es dependiente de las proteínas del grupo PcG. 5) La interacción molecular con las proteínas SCE y PHO, ambas del grupo PcG y, 4) La sobre-expresión de la proteína dRYBP induce la generación de fenotipos homeóticos. Se ha hipotetizado que el mecanismo por el que se produce es debido a la interacción de dRYBP con los complejos PcG y trxG, por tanto la proteína dRYBP sería capaz de reclutar proteínas PcG y trxG.

CONCLUSIONES

1. En *Drosophila* existe un solo gen *dRYBP*, conservado filogenéticamente, y que origina una única proteína con un dominio Zinc Finger.
2. La proteína dRYBP se expresa nuclear y ubicuamente durante todo el desarrollo, incluso en el núcleo del oocito. El patrón de expresión nuclear de dRYBP coincide con los “cuerpos Polycomb”. El patrón de expresión durante la mitosis es dinámico, disociándose de la cromatina en metafase y asociándose en anafase.
3. La falta de función del gen *dRYBP* produce fenotipos con penetrancia y expresividad variable entre los que se incluyen: a) letalidad a lo largo del desarrollo, b) retraso del desarrollo, c) defectos en la progresión de la mitosis, d) aparición de melanizaciones en el tejido larvario, e) disminución del tamaño de los discos imaginales, f) falta de aposición en las superficies ventrales y dorsales en el ala y g) esterilidad.
4. La proteína GAL4DB-dRYBP se comporta como un represor transcripcional durante todo el desarrollo. Esta represión es dependiente de proteínas del grupo PcG.
5. El gen *dRYBP* interacciona genéticamente con *Sex comb extra*, del grupo PcG y con *trithorax*, del grupo trxG. Asimismo la proteína dRYBP interacciona molecularmente con SCE y con PHO, ambas proteínas del grupo PcG.
6. La sobre-expresión de dRYBP genera a) la aparición de fenotipos homeóticos dependientes de la proteínas PcG y trxG y b) la pérdida del silenciamiento transcripcional ejercido por el elemento MCP138 del gen homeótico *Abdominal-B*.
7. El mecanismo por el que se generan los fenotipos homeóticos podría ser debido a que dRYBP “secuestre” las proteínas PcG y trxG. Si este es el caso, la proteína dRYBP tiene la capacidad de reclutar complejos PcG y trxG. Además, este reclutamiento parece tener lugar mediante la interacción con el dominio C-terminal de la proteína dRYBP.
8. La sobre-expresión de dRYBP activa la apoptosis exclusivamente en los discos imaginales de ala y halterio. Esta activación depende de los factores apoptóticos y de las proteínas dFADD y DREDD. También, la activación de la apoptosis parece requerir el N-terminal de la proteína dRYBP.
9. La apoptosis inducida por dRYBP es modulada por los niveles de la proteína TRX. Además, altos niveles de la proteína TRX, pero no de las proteínas PC ni SCE, activan la apoptosis.
10. El gen *dRYBP* tiene propiedades tanto de los genes *Polycomb* como de los genes *trithorax*, lo que le califica dentro en el grupo de genes ETP (Enhancer of Trithorax and Polycomb).

BIBLIOGRAFÍA

Abrams, J. M., White, K., Fessler, L. I. y Steller, H. (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **117**, 29-43.

Adachi-Yamada, T., Fujimura-Kamada, K., Nishida, Y. y Matsumoto, K. (1999). Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature* **400**, 166-9.

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brot-tier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A. A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T. C., McLeod, M. P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacle, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A. H., Wang, X., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., Woodage, T., Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J. S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X. H., Zhong, F. N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H. O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M. y Venter, J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-95.

Akam, M., Averof, M., Castelli-Gair, J., Dawes, R., Falciani, F. y Ferrier, D. (1994). The evolving role of Hox genes in arthropods. *Dev Suppl*, 209-15.

Alberts, B., Bray, D., Raff, M., Robert, K. y Watson, J. D. (2002). Molecular Biology of the Cell. . New York, London: Garland Publishing, Inc.

Alkema, M. J., Bronk, M., Verhoeven, E., Otte, A., van 't Veer, L. J., Berns, A. y van Lohuizen, M. (1997). Identification of Bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mammalian polycomb complex. *Genes Dev* **11**, 226-40.

Alkema, M. J., Bronk, M., Verhoeven, E., Otte, A., Veer, L. j., Berns, A. y Lohuizen, M. v. L. (1996). Identification of Bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mam-malian Polycomb complex. *Genes & Development* **11**, 226-240.

Arrigoni, R., Alam, S. L., Wamstad, J. A., Bardwell, V. J., Sundquist, W. I. y Schreiber-Agus, N. (2006). The Polycomb-associated protein Rybp is a ubiquitin binding protein. *FEBS Lett* **580**, 6233-41.

Ashburner, M. (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Atchison, L., Ghias, A., Wilkinson, F., Bonini, N. y Atchison, M. L.** (2003). Transcription factor YY1 functions as a PcG protein in vivo. *Embo J* **22**, 1347-58.
- Balicky, E. M., Young, L., Orr-Weaver, T. L. y Bickel, S. E.** (2003). A proposed role for the Polycomb group protein dRING in meiotic sister-chromatid cohesion. *Chromosoma*.
- Bantignies, F., Goodman, R. H. y Smolik, S. M.** (2000). Functional interaction between the coactivator Drosophila CREB-binding protein and ASH1, a member of the trithorax group of chromatin modifiers. *Mol Cell Biol* **20**, 9317-30.
- Barges, S., Mihaly, J., Galloni, M., Hagstrom, K., Muller, M., Shanower, G., Schedl, P., Gyurkovics, H. y Karch, F.** (2000). The Fab-8 boundary defines the distal limit of the bithorax complex iab-7 domain and insulates iab-7 from initiation elements and a PRE in the adjacent iab-8 domain. *Development* **127**, 779-90.
- Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E. y Sauer, F.** (2002). Histone methylation by the Drosophila epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* **419**, 857-62.
- Bejarano, F. y Busturia, A.** (2004). Function of the Trithorax-like gene during Drosophila development. *Dev Biol* **268**, 327-41.
- Bejarano, F., Gonzalez, I., Vidal, M. y Busturia, A.** (2005). The Drosophila RYBP gene functions as a Polycomb-dependent transcriptional repressor. *Mech Dev* **122**, 1118-29.
- Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G., He, Y., Carlson, J. W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P. R., Schulze, K. L., Rubin, G. M., Hoskins, R. A. y Spradling, A. C.** (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of Drosophila genes. *Genetics* **167**, 761-81.
- Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R. K. y Gehring, W. J.** (1989). P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in Drosophila. *Genes Dev* **3**, 1288-300.
- Bender, W., Akam, M., Karch, F., Beachy, P., Peifer, M., Spierer, P., Lewis, E. B. y Hogness, D. S.** (1983). Molecular Genetics of the Bithorax COMplex in Drosophila melanogaster. *Science* **221**, 23-32.
- Bienz, M. y Muller, J.** (1995). Transcriptional silencing of homeotic genes in Drosophila. *Bioessays* **17**, 775-84.
- Bornemann, D., Miller, E. y Simon, J.** (1996). The Drosophila polycomb group gene *Sex comb on midleg (Scm)* encodes a zinc finger protein with similarity to polyhomeotic protein. *Development* **122**, 1621-1630.
- Boutros, M., Kiger, A. A., Armknecht, S., Kerr, K., Hild, M., Koch, B., Haas, S. A., Paro, R. y Perrimon, N.** (2004). Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in Drosophila cells. *Science* **303**, 832-5.
- Brand, A. H. y Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**.
- Breen, T. R., Chinwalla, V. y Harte, P. J.** (1995). Trithorax is required to maintain engrailed expression in a subset of engrailed-expressing cells. *Mech. Dev.* **52**, 89-98.
- Breen, T. R. y Harte, P. J.** (1991). Molecular characterization of the trithorax gene, a positive regulator of homeotic gene expression in Drosophila. *Mech Dev* **35**, 113-27.
- Breen, T. R. y Harte, P. J.** (1993). Trithorax regulates multiple homeotic genes in the bithorax and Antennapedia complexes and exerts different tissue-specific, parasegment-specific and promoter-specific effects on each. *Development* **117**, 119-34.
- Brizuela, B. J., Elfring, L., Ballard, J., Tamkun, J. W. y Kennison, J. A.** (1994). Genetic analysis of the brahma gene of Drosophila melanogaster and polytene chromosome subdivisions 72AB. *Genetics* **137**, 803-13.
- Brock, H. W. y Fisher, C. L.** (2005). Maintenance of gene expression patterns. *Dev Dyn* **232**, 633-55.
- Brodsky, M. H., Weinert, B. T., Tsang, G., Rong, Y. S., McGinnis, N. M., Golic, K. G., Rio,**

- D. C. y Rubin, G. M.** (2004). *Drosophila melanogaster* MNK/Chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage. *Mol Cell Biol* **24**, 1219-31.
- Brown, J. L., Fritsch, C., Mueller, J. y Kassis, J. A.** (2003). The *Drosophila* pho-like gene encodes a YY1-related DNA binding protein that is redundant with pleiohomeotic in homeotic gene silencing. *Development* **130**, 285-94.
- Brown, J. L., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, M. L. y Kassis, J. A.** (1998). The *Drosophila* Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol Cell* **1**, 1057-64.
- Buchenau, P., Hodgson, J., Strutt, H. y Ardnht-JOven, D. J.** (1998). The Distribution of Polycomb-Group Proteins During Cell Division and Development in *Drosophila* Embryos: Impact on Models for Silencing. *The Journal of Cell Biology* **141**, 469-481.
- Busturia, A. y Bienz, M.** (1993). Silencers in *Abdominal-B*, a homeotic *Drosophila* gene. *EMBO J.* **12**, 1415-1425.
- Busturia, A., Casanova, J., Sanchez-Herrero, E., Gonzalez, R. y Morata, G.** (1989). Genetic structure of the *abd-A* gene of *Drosophila*. *Development* **107**, 575-83.
- Busturia, A., Lloyd, A., Bejarano, F., Zavortink, M., Xin, H. y Sakonju, S.** (2001). The MCP silencer of the *Drosophila* *Abd-B* gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the maintenance of repression. *Development* **128**, 2163-73.
- Busturia, A. y Morata, G.** (1988). Ectopic expression of homeotic genes caused by the elimination of the Polycomb gene in *Drosophila* imaginal epidermis. *Development* **104**, 713-729.
- Busturia, A., Wightman, C. D. y Sakonju, S.** (1997). A silencer is required for maintenance of transcriptional repression throughout *Drosophila* development. *Development* **124**, 4343-50.
- Cabrera, C. V., Botas, J. y Garcia-Bellido, A.** (1985). Distribution of Ultrabithorax proteins in mutants of *Drosophila* bithorax complex genes and its transregulatory genes. *Nature* **318**, 569-571.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. y Morata, G.** (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-5.
- Campbell, R. B., Sinclair, D. A., Couling, M. y Brock, H. W.** (1995). Genetic interactions and dosage effects of Polycomb group genes of *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 291-300.
- Campos-Ortega, J. A. y Hartenstein, V.** (1985). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Berlin: Springer-Verlag.
- Carrington, E. A. y Jones, R. S.** (1996). The *Drosophila* Enhancer of zeste gene encodes a chromosomal protein: examination of wild-type and mutant protein distribution. *Development* **122**, 4073-4083.
- Casanova, J., Sanchez-Herrero, E. y Morata, G.** (1986). Identification and characterization of a parasegment specific regulatory element of the *Abdominal-B* gene of *Drosophila*. *Cell* **47**, 627-636.
- Castelli-Gair, J. E. y Garcia-Bellido, A.** (1990). Interactions of *Polycomb* and *trithorax* with cis regulatory regions of Ultrabithorax during the development of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **9**, 4267-4275.
- Celniker, S. E., Keelan, D. J. y Lewis, E. B.** (1989). The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the *Abdominal-B* domain. *Genes Dev.* **3**, 1424-1436.
- Celniker, S. E., Sharma, S., Keelan, D. J. y Lewis, E. B.** (1990). The molecular genetics of the Bithorax complex of *Drosophila*: cis-regulation in the *Abdominal-B* domain. *EMBO J.* **9**, 4277-4286.
- Clem, R. J., Fechheimer, M. y Miller, L. K.** (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* **254**, 1388-90.

- Collins, R. T. y Treisman, J. E.** (2000). Osa-containing Brahma chromatin remodeling complexes are required for the repression of wingless target genes. *Genes Dev* **14**, 3140-52.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. y Pirrotta, V.** (2002). Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**, 185-96.
- Chanas, G., Lavrov, S., Iral, F., Cavalli, G. y Maschat, F.** (2004). Engrailed and polyhomeotic maintain posterior cell identity through cubitus-interruptus regulation. *Dev Biol* **272**, 522-35.
- Chang, Y. L., Peng, Y. H., Pan, I. C., Sun, D. S., King, B. y Huang, D. H.** (2001). Essential role of Drosophila Hdac1 in homeotic gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9730-5.
- Chen, P., Nordstrom, W., Gish, B. y Abrams, J. M.** (1996). grim, a novel cell death gene in Drosophila. *Genes Dev* **10**, 1773-82.
- Cheng, N. N., Sinclair, D. A., Campbell, R. B. y Brock, H. W.** (1994). Interactions of polyhomeotic with Polycomb group genes of Drosophila melanogaster. *Genetics* **138**, 1151-62.
- Chiang, A., O'Connor, M. B., Paro, R., Simon, J. y Bender, W.** (1995). Discrete Polycomb-binding sites in each parasegmental domain of the bithorax complex. *Development* **121**, 1681-1689.
- Danen-van Oorschot, A. A., Voskamp, P., Seelen, M. C., van Miltenburg, M. H., Bolk, M. W., Tait, S. W., Boesen-de Cock, J. G., Rohn, J. L., Borst, J. y Noteborn, M. H.** (2004). Human death effector domain-associated factor interacts with the viral apoptosis agonist Apoptin and exerts tumor-preferential cell killing. *Cell Death Differ* **11**, 564-73.
- de Celis, J. F., Bray, S. y Garcia-Bellido, A.** (1997). Notch signalling regulates veinlet expression and establishes boundaries between veins and interveins in the Drosophila wing. *Development* **124**, 1919-28.
- de Navas, L., Foronda, D., Suzanne, M. y Sanchez-Herrero, E.** (2006). A simple and efficient method to identify replacements of P-lacZ by P-Gal4 lines allows obtaining Gal4 insertions in the bithorax complex of Drosophila. *Mech Dev*.
- de Navas, L. F., Garaulet, D. L. y Sanchez-Herrero, E.** (2006). The Ultrabithorax Hox gene of Drosophila controls haltere size by regulating the Dpp pathway. *Development*.
- DeGregori, J. y Johnson, D. G.** (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med* **6**, 739-48.
- DeLorenzi, M., Ali, N., Saari, G., Henry, C., Wilcox, M. y Bienz, M.** (1988). Evidence that the *Abdominal-B* r element function is conferred by a trans-regulatory homeoprotein. *EMBO J.* **7**, 3223-3231.
- Dingwall, A., Beek, S. J., McCallum, C. M., Tamkun, J. W., Kalpana, G. V., Goff, S. P. y Scott, M. P.** (1995). The Drosophila snr1 brm Proteins Are Related to Yeast SW1/SNF Proteins and Are COmponents of a Large Protein COmplex. *MOlecular Biology of the Cell* **6**, 777-791.
- Docquier, F., Forquignon, F., Randsholt, N., Saget, O. y Santamaria, P.** (1994). multi sex combs : A Polycomb-group (Pc-G) gene required in soma and germ line that also functions as a Tumour suppressor. *EMBO Workshop in Kolymbari (Crete)*.
- Duncan, I.** (1982). Polycomblake: A gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of Drosophila melanogaster. *Genetics* **102**, 49-70.
- Duncan, I.** (1987). The bithorax complex. *Annu. Rev. Genet.* **21**, 285-319.
- Dura, J. M. y Ingham, P.** (1988). Tissue- and stage-specific control of homeotic and segmentation gene expression in Drosophila embryos by the polyhomeotic gene. *Development* **103**, 733-41.
- Edgar, B. A. y O'Farrell, P. H.** (1989). Genetic control of cell division patterns in the Drosophila embryo. *Cell* **57**, 177-87.
- Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., Gyurkovics, H. y Karch, F.** (1994). The Trithorax-like gene encodes the Drosophila GAGA factor. *Nature* **371**, 806-808.

- Faucheux, M., Roignant, J. Y., Netter, S., Charollais, J., Antoniewski, C. y Theodore, L.** (2003). batman Interacts with polycomb and trithorax group genes and encodes a BTB/POZ protein that is included in a complex containing GAGA factor. *Mol Cell Biol* **23**, 1181-95.
- Felix, C. A., Winick, N. J., Negrini, M., Bowman, W. P., Croce, C. M. y Lange, B. J.** (1993). Common region of ALL-1 gene disrupted in epipodophyllotoxin-related secondary acute myeloid leukemia. *Cancer Res* **53**, 2954-6.
- Ferguson, E. L. y Anderson, K. V.** (1992). Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the Drosophila embryo. *Cell* **71**, 451-61.
- Ferres-Marco, D., Gutierrez-Garcia, I., Vallejo, D. M., Bolivar, J., Gutierrez-Avino, F. J. y Dominguez, M.** (2006). Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* **439**, 430-6.
- Flaus, A. y Owen-Hughes, T.** (2001). Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 148-54.
- Flybase.** (1999). The Flybase database of the Drosophila genome projects and community literature. *Nucleic Acids Res* **27**, 85-88.
- Francis, N. J. y Kingston, R. E.** (2001). Mechanisms of transcriptional memory. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 409-21.
- Francis, N. J., Saurin, A. J., Shao, Z. y Kingston, R. E.** (2001). Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Mol Cell* **8**, 545-56.
- Franke, A., DeCamillis, M., Zink, D., Cheng, N., Brock, H. W. y Paro, R.** (1992). Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of Drosophila melanogaster. *Embo J* **11**, 2941-50.
- Franke, A., Messmer, S. y Paro, R.** (1995). Mapping functional domains of the polycomb protein of Drosophila melanogaster. *Chromosome Res* **3**, 351-60.
- Fraser, A. G. y Evan, G. I.** (1997). Identification of a Drosophila melanogaster ICE/CED-3-related protease, drICE. *Embo J* **16**, 2805-13.
- Fraser, A. G., McCarthy, N. J. y Evan, G. I.** (1997). drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in Drosophila cells. *Embo J* **16**, 6192-9.
- Fritsch, C., Brown, J. L., Kassisi, J. A. y Muller, J.** (1999). The DNA-binding polycomb group protein pleiohomeotic mediates silencing of a Drosophila homeotic gene. *Development* **126**, 3905-13.
- Galloni, M., Gyurkovics, H., Schedl, P. y Karch, F.** (1993). The bluetail transposon: evidence for independent cis-regulatory domains and domain boundaries in the bithorax complex. *Embo J* **12**, 1087-97.
- Garcia-Bellido, A., ripoll, P. y Morata, G.** (1973). Developmental compartmentalization of the wing disk of Drosophila. *Nature* **245**, 251-253.
- Garcia, E., Marcos-Gutierrez, C., del Mar Lorente, M., Moreno, J. C. y Vidal, M.** (1999). RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1. *Embo J* **18**, 3404-18.
- Gatti, M. y Baker, B. S.** (1989). Genes controlling essential cell-cycle functions in Drosophila melanogaster. *Genes Dev* **3**, 438-53.
- Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Reichhart, J. M. y Hoffmann, J. A.** (2001). Drosophila immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Dev Cell* **1**, 503-14.
- Gildea, J. J., Lopez, R. y Shearn, A.** (2000). A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the Drosophila melanogaster homologue of human retinoblastoma binding protein 2. *Genetics* **156**, 645-63.
- Giordano, E., Rendina, R., Peluso, I. y Furia, M.** (2002). RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in Drosophila melanogaster. *Genetics* **160**, 637-48.

- Golic, K.** (1993). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**, 499-509.
- Goodliffe, J. M., Wieschaus, E. y Cole, M. D.** (2005). Polycomb mediates Myc autorepression and its transcriptional control of many loci in *Drosophila*. *Genes Dev* **19**, 2941-6.
- Gorfinkel, N., Fanti, L., Melgar, T., Garcia, E., Pimpinelli, S., Guerrero, I. y Vidal, M.** (2004). The *Drosophila* Polycomb group gene *Sex combs extra* encodes the ortholog of mammalian Ring1 proteins. *Mech Dev* **121**, 449-62.
- Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwig, E. y Steller, H.** (2000). Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *Embo J* **19**, 589-97.
- Harding, K. y Levine, M.** (1988). Gap genes define the limits of Antennapedia and Bithorax gene expression during early development in *Drosophila*. *EMBO J.* **7**, 205-214.
- Hay, B. A. y Guo, M.** (2006). Caspase-dependent cell death in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 623-50.
- Hay, B. A., Huh, J. R. y Guo, M.** (2004). The genetics of cell death: approaches, insights and opportunities in *Drosophila*. *Nat Rev Genet* **5**, 911-22.
- Hay, B. A., Wolff, T. y Rubin, G. M.** (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 2121-9.
- Hodgson, J. W., Argiropoulos, B. y Brock, H. W.** (2001). Site-specific recognition of a 70-base-pair element containing d(GA)(n) repeats mediates bithoraxoid polycomb group response element-dependent silencing. *Mol Cell Biol* **21**, 4528-43.
- Holmes, A. M., Weedmark, K. A. y Gloor, G. B.** (2006). Mutations in the extra sex combs and Enhancer of Polycomb genes increase homologous recombination in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **172**, 2367-77.
- Horard, B., Tatout, C., Poux, S. y Pirrotta, V.** (2000). Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Mol Cell Biol* **20**, 3187-97.
- Horowitz, H. y Berg, C. A.** (1996). The *Drosophila* pipsqueak gene encodes a nuclear BTB-domain-containing protein required early in oogenesis. *Development* **122**, 1859-71.
- Hu, S. y Yang, X.** (2000). dFADD, a novel death domain-containing adapter protein for the *Drosophila* caspase DREDD. *J Biol Chem* **275**, 30761-4.
- Huang, D. H., Chang, Y. L., Yang, C. C., Pan, I. C. y King, B.** (2002). pipsqueak encodes a factor essential for sequence-specific targeting of a polycomb group protein complex. *Mol Cell Biol* **22**, 6261-71.
- Ingham, P. W.** (1981). Trithorax: a new homeotic mutation of *Drosophila melanogaster*. *Roux Arch. Dev. Biol.* **190**, 365-369.
- Ingham, P. W.** (1985). A clonal analysis of the requirement for the trithorax gene in the diversification of segments in *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol* **89**, 349-65.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. y Yamamoto, D.** (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**, 761-71.
- Jack, T. y McGinnis, W.** (1990). Establishment of the Deformed expression stripe requires the combinatorial action of coordinate, gap and pair-rule proteins. *Embo J* **9**, 1187-98.
- Jackle, H., Hoch, M., Pankratz, M. J., Gerwin, N., Sauer, F. y Bronner, G.** (1992). Transcriptional control by *Drosophila* gap genes. *J. of Cell Science* **16**, 39-51.
- Jacobs, J. J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R. A. y van Lohuizen, M.** (1999). The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* **397**, 164-8.
- Jacobs, J. J., Scheijen, B., Voncken, J. W., Kieboom, K., Berns, A. y van Lohuizen, M.** (1999). *Bmi-1* collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via *INK4a/ARF*. *Genes Dev* **13**, 2678-90.

- Jacobs, J. J. y van Lohuizen, M.** (2002). Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1602**, 151-61.
- James, T. C., Eissenberg, J. C., Craig, C., Dietrich, V., Hobson, A. y Elgin, S. C.** (1989). Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur J Cell Biol* **50**, 170-80.
- Jenny, A., Hachet, O., Zavorszky, P., Cyrklaff, A., Weston, M. D., Johnston, D. S., Erdelyi, M. y Ephrussi, A.** (2006). A translation-independent role of oskar RNA in early *Drosophila* oogenesis. *Development* **133**, 2827-33.
- Jones, C. A., Ng, J., Peterson, A. J., Morgan, K., Simon, J. y Jones, R. S.** (1998). The *Drosophila* esc and E(z) proteins are direct partners in polycomb group-mediated repression. *Mol Cell Biol* **18**, 2825-34.
- Jürgens, G.** (1985). A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* **316**, 153-155.
- Kahn, T. G., Schwartz, Y. B., Dellino, G. I. y Pirrotta, V.** (2006). Polycomb complexes and the propagation of the methylation mark at the *Drosophila* Ubx gene. *J Biol Chem*.
- Kai, T., Williams, D. y Spradling, A. C.** (2005). The expression profile of purified *Drosophila* germline stem cells. *Dev Biol* **283**, 486-502.
- Kal, A. J., Mahmoudi, T., Zak, N. B. y Verrijzer, C. P.** (2000). The *Drosophila* brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev* **14**, 1058-71.
- Karch, F., Bender, W. y Weiffenbach, B.** (1990). *abdA* expression in *Drosophila* embryos. *Genes Dev* **4**, 1573-1587.
- Karch, F., Weiffenbach, B., Peifer, M., Bender, W., Duncan, I., Celniker, S., Crosby, M. y Lewis, E. B.** (1985). The abdominal region of the Bithorax complex. *Cell* **43**, 81-96.
- Kaufman, T. C., Seeger, M. A. y Olsen, G.** (1990). Molecular and genetic organization of the Antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv. Genet.* **27**, 309-362.
- Keegan, L., Gill, G. y Ptashne, M.** (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**, 699-704.
- Kellerman, K. A., Mattson, D. M. y Duncan, I.** (1990). Mutations affecting the stability of the fushi tarazu protein of *Drosophila*. *Genes Dev* **4**, 1936-50.
- Kennison, J.** (1993). Transcriptional activation of *Drosophila* homeotic genes from distant regulatory elements. *TIG* **9**, 75-79.
- Kennison, J. y Tamkun, J.** (1988). Dosage-dependent modifiers of Polycomb and Antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 8136-8140.
- Kennison, J. A.** (1995). The polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Ann. Rev. Genetics* **29**, 289-303.
- Khavari, P. A., Peterson, C. L., Tamkun, J. W., Mendel, D. B. y Crabtree, G. R.** (1993). BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature* **366**, 170-4.
- Kiernan, J. A.** (2001). Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes. *Biotech Histochem* **76**, 261-78.
- Kiger, J. A., Jr., Natzle, J. E. y Green, M. M.** (2001). Hemocytes are essential for wing maturation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10190-5.
- Kingston, R. E. y Narlikar, G. J.** (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* **13**, 2339-52.
- Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Kocher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M. y Muller, J.** (2006). A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes Dev* **20**, 1110-22.
- Kodjabachian, L., Delaage, M., Maurel, C., Miassod, R., Jacq, B. y Rosset, R.** (1998). Mutations in *ccf*, a novel *Drosophila* gene encoding a chromosomal factor, affect progression through mitosis and interact with Pc-G mutations. *Embo J* **17**, 1063-75.

- Kornfeld, K., Saint, R. B., Beachy, P. A., Harte, P. J., Peattie, D. A. y Hogness, D. S.** (1989). Structure and expression of a family of *Ultrabithorax* mRNAs generated by alternative splicing and polyadenylation in *Drosophila*. *Genes Dev.* **3**, 243-258.
- Kouzarides, T.** (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 198-209.
- Krause, H. M. y Gehring, W. J.** (1988). The location, modification, and function of the fushi tarazu protein during *Drosophila* embryogenesis. *Prog Clin Biol Res* **284**, 105-23.
- Krumlauf, R.** (1994). *Hox* genes in vertebrate development. *Cell* **78**, 191-201.
- Kyba, M. y Brock, H. W.** (1998). The *Drosophila* polycomb group protein Psc contacts ph and Pc through specific conserved domains. *Mol Cell Biol* **18**, 2712-20.
- LaJeunesse, D. y Shearn, A.** (1996). E(z): a polycomb group gene or a trithorax group gene? *Development* **122**, 2189-97.
- Lawrence, P.** (1992). The Making of a fly. The genetics of Animal Design. *Oxford Blackwell Scientific Publications*.
- Lee, N., Maurange, C., Ringrose, L. y Paro, R.** (2005). Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* **438**, 234-7.
- Lehmann, M., Siegmund, T., Lintermann, K. G. y Korge, G.** (1998). The pipsqueak protein of *Drosophila melanogaster* binds to GAGA sequences through a novel DNA-binding domain. *J Biol Chem* **273**, 28504-9.
- Lemaitre, B. y Hoffmann, J.** (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*.
- Lessard, J. y Sauvageau, G.** (2003). Polycomb group genes as epigenetic regulators of normal and leukemic hemopoiesis. *Exp Hematol* **31**, 567-85.
- Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R. S., Abrams, J. M. y Lemaitre, B.** (2000). The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep* **1**, 353-8.
- Lewis, E.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-570.
- Lewis, E. B.** (1954). The theory and application of a new method of detecting chromosomal rearrangements in *Drosophila melanogaster*. *Am. Nat.* **88**, 225-239.
- Lindsley, D. y Zimm, G.** (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. *Academic Press, Inc.*
- Locksley, R. M., Killeen, N. y Lenardo, M. J.** (2001). The TNF and TNF receptor super-families: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.
- Lonie, A., D'Andrea, R., Paro, R. y Saint, R.** (1994). Molecular characterization of the Polycomblike gene of *Drosophila melanogaster*, a trans-acting negative regulator of homeotic gene expression. *Development* **120**, 2629-2636.
- Lopez, A., Higuete, D., Rosset, R., Deutsch, J. y Peronnet, F.** (2001). corto genetically interacts with Pc-G and trx-G genes and maintains the anterior boundary of *Ultrabithorax* expression in *Drosophila* larvae. *Mol Genet Genomics* **266**, 572-83.
- Lund, A. H. y van Lohuizen, M.** (2004). Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 239-46.
- Lupo, R., Breiling, A., Bianchi, M. E. y Orlando, V.** (2001). *Drosophila* chromosome condensation proteins Topoisomerase II and Barren colocalize with Polycomb and maintain Fab-7 PRE silencing. *Mol Cell* **7**, 127-36.
- Macias, A., Casanova, J. y Morata, G.** (1990). Expression and regulation of the *abd-A* gene of *Drosophila*. *Development* **110**, 1197-1207.
- Mahmoudi, T. y Verrijzer, C. P.** (2001). Chromatin silencing and activation by Polycomb and trithorax group proteins. *Oncogene* **20**, 3055-66.

- Mahmoudi, T., Zuijderduijn, L. M., Mohd-Sarip, A. y Verrijzer, C. P.** (2003). GAGA facilitates binding of Pleiohomeotic to a chromatinized Polycomb response element. *Nucleic Acids Res* **31**, 4147-56.
- Manak, J. R. y Scott, M. P.** (1994). A class act: conservation of homeodomain protein functions. *Development Suppl.*, 61-71.
- Marmorstein, R. y Roth, S. Y.** (2001). Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 155-61.
- Martin, C. H., Mayeda, C. A., Davis, C. A., Ericsson, C. L., Knafels, J. D., Mathog, D. R., Celniker, S. E., Lewis, E. B. y Palazzolo, M. J.** (1995). Complete sequence of the bithorax complex of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8398-8402.
- Martin, E. C. y Adler, P. N.** (1993). The Polycomb group gene Posterior Sex Combs encodes a chromosomal protein. *Development* **117**, 641-55.
- Martinez-Arias, A. y Lawrence, P.** (1985). Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature* **313**, 639-642.
- Martinez, A. M. y Cavalli, G.** (2006). The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle* **5**, 1189-97.
- Martinez, A. M., Colomb, S., Dejardin, J., Bantignies, F. y Cavalli, G.** (2006). Polycomb group-dependent Cyclin A repression in *Drosophila*. *Genes Dev* **20**, 501-13.
- Maschat, F., Serrano, N., Randsholt, N. B. y Geraud, G.** (1998). engrailed and polyhomeotic interactions are required to maintain the A/P boundary of the *Drosophila* developing wing. *Development* **125**, 2771-80.
- Mazo, A. M., Huang, D. H., Mozer, B. A. y Dawid, I. B.** (1990). The trithorax gene, a transacting regulator of the bithorax complex in *Drosophila*, encodes a protein with zinc-binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2112-6.
- McCall, K. y Bender, W.** (1996). Probes of chromatin accessibility in the *Drosophila* bithorax complex respond differently to Polycomb-mediated repression. *Embo J* **15**, 569-80.
- McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A. y Gehring, W. J.** (1984). A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *bithorax* complexes. *Nature* **308**, 428-433.
- Mckee, J., Slade, E., Sinclair, D., Cheng, N., Couling, M. y Brock, H.** (1994). Mutations in some Polycomb group genes of *Drosophila* interfere with regulation of segmentation genes. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 474-483.
- Meyer, H. H., Shorter, J. G., Seemann, J., Pappin, D. y Warren, G.** (2000). A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *Embo J* **19**, 2181-92.
- Minakhina, S. y Steward, R.** (2006). Melanotic mutants in *Drosophila*: pathways and phenotypes. *Genetics* **174**, 253-63.
- Mishra, R. K., Mihaly, J., Barges, S., Spierer, A., Karch, F., Hagstrom, K., Schweinsberg, S. E. y Schedl, P.** (2001). The iab-7 polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity. *Mol Cell Biol* **21**, 1311-8.
- Morata, G. y Lawrence, P. A.** (1975). Control of compartment development by the *engrailed* gene of *Drosophila*. *Nature, (Lond)* **255**, 614-617.
- Morata, G. y Ripoll, P.** (1975). Minutes: Mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* **42**, 211-221.
- Morata, G., Sanchez, H. E. y Casanova, J.** (1986). The bithorax complex of *Drosophila* an overview. *Cell Differ.* **18**, 67-78.
- Moreno, E. y Morata, G.** (1999). Caudal is the Hox gene that specifies the most posterior *Drosophila* segment. *Nature* **400**, 873-7.
- Moreno, E., Yan, M. y Basler, K.** (2002). Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-de-

pendent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Curr Biol* **12**, 1263-8.

Muchardt, C. y Yaniv, M. (1993). A human homologue of *S. cerevisiae* SNF2/SW12 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **12**, 4279-4290.

Mulholland, N. M., King, I. F. y Kingston, R. E. (2003). Regulation of Polycomb group complexes by the sequence-specific DNA binding proteins Zeste and GAGA. *Genes Dev* **17**, 2741-6.

Muller, J. (1995). Transcriptional silencing by the polycomb protein in *Drosophila* embryos. *EMBO J.* **14**, 1209-1220.

Muller, J., Gaunt, S. y Lawrence, P. A. (1995). Function of the polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development* **121**, 2847-2852.

Muller, J., Hart, C. M., Francis, N. J., Vargas, M. L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E. L., O'Connor, M. B., Kingston, R. E. y Simon, J. A. (2002). Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**, 197-208.

Muyrers-Chen, I., Rozovskaia, T., Lee, N., Kersey, J. H., Nakamura, T., Canaani, E. y Paro, R. (2004). Expression of leukemic MLL fusion proteins in *Drosophila* affects cell cycle control and chromosome morphology. *Oncogene* **23**, 8639-8648.

Nagel, A. C., Maier, D. y Preiss, A. (2002). Green fluorescent protein as a convenient and versatile marker for studies on functional genomics in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* **212**, 93-8.

Naitza, S., Rosse, C., Kappler, C., Georgel, P., Belvin, M., Gubb, D., Camonis, J., Hoffmann, J. A. y Reichhart, J. M. (2002). The *Drosophila* immune defense against gram-negative infection requires the death protein dFADD. *Immunity* **17**, 575-81.

Narbonne, K., Besse, F., Brissard-Zahraoui, J., Pret, A. M. y Busson, D. (2004). polyhomeotic is required for somatic cell proliferation and differentiation during ovarian follicle formation in *Drosophila*. *Development* **131**, 1389-400.

Neufeld, T. P., de la Cruz, A. F., Johnston, L. A. y Edgar, B. A. (1998). Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* **93**, 1183-93.

Ng, J., Hart, C. M., Morgan, K. y Simon, J. A. (2000). A *Drosophila* ESC-E(Z) protein complex is distinct from other polycomb group complexes and contains covalently modified ESC. *Mol Cell Biol* **20**, 3069-78.

Noteborn, M. H. (2005). Apoptin acts as a tumor-specific killer: potentials for an anti-tumor therapy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **51**, 49-60.

O'Dor, E., Beck, S. A. y Brock, H. W. (2006). Polycomb group mutants exhibit mitotic defects in syncytial cell cycles of *Drosophila* embryos. *Dev Biol* **290**, 312-22.

Orlando, V., Jane, E. P., Chinwalla, V., Harte, P. J. y Paro, R. (1998). Binding of trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. *Embo J* **17**, 5141-50.

Orlando, V. y Paro, R. (1993). Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* **75**, 1187-1198.

Orlando, V. y Paro, R. (1995). Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns. *Current Biology* **5**, 174-179.

Otte, A. P. y Kwaks, T. H. (2003). Gene repression by Polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion? *Curr Opin Genet Dev* **13**, 448-54.

Oyama, R., Takashima, H., Yonezawa, M., Doi, N., Miyamoto-Sato, E., Kinjo, M. y Yanagawa, H. (2006). Protein-protein interaction analysis by C-terminally specific fluorescence labeling and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Res* **34**, e102.

Papoulas, O., Beek, S. J., Moseley, S. L., McCallum, C. M., Sarte, M., Shearn, A. y Tamkun, J. W. (1998). The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* **125**, 3955-66.

- Papp, B. y Muller, J.** (2006). Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins. *Genes Dev* **20**, 2041-54.
- Parras, C., Garcia-Alonso, L. A., Rodriguez, I. y Jimenez, F.** (1996). Control of neural precursor specification by proneural proteins in the CNS of *Drosophila*. *Embo J* **15**, 6394-9.
- Patel, N. H., Martin-Blanco, E., Coleman, K., Poole, S., Ellis, M., Konrberg, T. y Goodman, C.** (1989). Expression of *engrailed* proteins in arthropods annelids and chrodates. *cell* **58**, 955-968.
- Pelegri, F. y Lehman, R.** (1994). A role of Polycomb Group of genes in the regulation of gap gene expression in *Drosophila*. *Genetics* **136**, 1341-1353.
- Peterson, A. J., Kyba, M., Bornemann, D., Morgan, K., Brock, H. W. y Simon, J.** (1997). A domain shared by the Polycomb group proteins Scm and ph mediates heterotypic and homotypic interactions. *Mol Cell Biol* **17**, 6683-92.
- Peterson, C., Dingwall, A. y Scott, M.** (1994). Five SW1SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2905-2908.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Smith, S., Tillib, S., Kraevski, V., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C. M. y Mazo, A.** (2001). Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* **294**, 1331-4.
- Phelan, M. L., Sif, S., Narlikar, G. J. y Kingston, R. E.** (1999). Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell* **3**, 247-53.
- Pilar Cubas, J.-F. d. C., Sonsoles Campuzano, and Juan Modolell.** (1991). Proneural clusters of achate-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes & Development* **5**, 996-1008.
- Pirity, M. K., Locker, J. y Schreiber-Agus, N.** (2005). Rybp/DEDAF is required for early postimplantation and for central nervous system development. *Mol Cell Biol* **25**, 7193-202.
- Pirrotta, V.** (1995). Chromatin complexes regulating gene expression in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 466-472.
- Pirrotta, V. y Rastelli, L.** (1994). white gene expression, repressive chromatin domains and homeotic gene regulation in *Drosophila*. *BioEssays* **16**, 549-555.
- Poux, S., Horard, B., Sigrist, C. J. y Pirrotta, V.** (2002). The *Drosophila* trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing. *Development* **129**, 2483-93.
- Poux, S., McCabe, D. y Pirrotta, V.** (2001). Recruitment of components of Polycomb Group chromatin complexes in *Drosophila*. *Development* **128**, 75-85.
- Poux, S., Melfi, R. y Pirrotta, V.** (2001). Establishment of Polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC. *Genes Dev* **15**, 2509-14.
- Qian, S., Capovilla, M. y Pirrota, V.** (1991). The bx region enhancer, a distant cis-control element of the *Ubx* gene and its regulation by hunchback and other segmentation genes. *EMBO J.*, 1415-1425.
- Raj, L., Vivekanand, P., Das, T. K., Badam, E., Fernandes, M., Finley, R. L., Brent, R., Appel, L. F., Hanes, S. D. y Weir, M.** (2000). Targeted localized degradation of Paired protein in *Drosophila* development. *Curr Biol* **10**, 1265-72.
- Rastelli, L., Chab, C. y Pirrota, V.** (1993). Related chromosome binding sites for zeste, suppressors of zeste and Polycomb group proteins in *Drosophila* and their dependence on Enhancer of zeste function. *EMBO J*, 1513-1522.
- Remillieux-Leschelle, N., Santamaria, P. y Randsholt, N. B.** (2002). Regulation of Larval Hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*. A role for the multi sex combs gene. *Genetics* **162**, 1259-74.
- Reuter, R. y Scott, M. P.** (1990). Expression and function of the homeotic genes *Antennapedia* and *Sex combs reduced* in the embryonic midgut of *Drosophila*. *Development* **109**, 289-304.

- Rohn, J. L. y Noteborn, M. H.** (2004). The viral death effector Apoptin reveals tumor-specific processes. *Apoptosis* **9**, 315-22.
- Ross, J. M. y Zarkower, D.** (2003). Polycomb group regulation of Hox gene expression in *C. elegans*. *Dev Cell* **4**, 891-901.
- Rubin, G. M. y Spradling, A. C.** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-53.
- Sanchez-Herrero, E.** (1991). Control of the expression of the bithorax complex genes abdominal-A and abdominal-B by cis-regulatory regions in *Drosophila* embryos. *Development* **111**, 437-49.
- Sanchez-Herrero, E. y Akam, M.** (1989). Spatially ordered transcription of regulatory DNA in the bithorax complex of *Drosophila*. *Development* **107**, 321-9.
- Sanchez-Herrero, E., Vernos, I., Marco, R. y Morata, G.** (1985). Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex. *Nature* **313**, 108-13.
- Sanson, B., White, P. y Vincent, J. P.** (1996). Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* **383**, 627-30.
- Santamaria, P. y Randsholt, N. B.** (1995). Characterization of a region of the X chromosome of *Drosophila* including *multi sex combs* (*mxc*), a polycomb group gene which also functions as a tumour suppressor. *Mol Gen Genet* **246**, 282-290.
- Satijn, D. P., Hamer, K. M., den Blaauwen, J. y Otte, A. P.** (2001). The polycomb group protein EED interacts with YY1, and both proteins induce neural tissue in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* **21**, 1360-9.
- Saurin, A. J., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. y Kingston, R. E.** (2001). A *Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature* **412**, 655-60.
- Saurin, A. J., Shiels, C., Williamson, J., Satijn, D. P., Otte, A. P., Sheer, D. y Freemont, P. S.** (1998). The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *J Cell Biol* **142**, 887-98.
- Sawa, C., Yoshikawa, T., Matsuda-Suzuki, F., Delehouzee, S., Goto, M., Watanabe, H., Sawada, J., Kataoka, K. y Handa, H.** (2002). YEAF1/RYPB and YAF-2 are functionally distinct members of a cofactor family for the YY1 and E4TF1/hGABP transcription factors. *J Biol Chem* **277**, 22484-90.
- Scott, M. P., Tamkun, J. W. y Hartzell, G. W., 3rd.** (1989). The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta* **989**, 25-48.
- Scott, M. P. y Weiner, A. J.** (1984). Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4115-9.
- Schickling, O., Stegh, A. H., Byrd, J. y Peter, M. E.** (2001). Nuclear localization of DEDD leads to caspase-6 activation through its death effector domain and inhibition of RNA polymerase I dependent transcription. *Cell Death Differ* **8**, 1157-68.
- Schoorlemmer, J., Marcos-Gutierrez, C., Were, F., Martinez, R., Garcia, E., Satijn, D. P., Otte, A. P. y Vidal, M.** (1997). Ring1A is a transcriptional repressor that interacts with the Polycomb-M33 protein and is expressed at rhombomere boundaries in the mouse hindbrain. *Embo J* **16**, 5930-42.
- Schweizer, D.** (1981). Counterstain-enhanced chromosome banding. *Hum Genet* **57**, 1-14.
- Schwendemann, A. y Lehmann, M.** (2002). Pipsqueak and GAGA factor act in concert as partners at homeotic and many other loci. *PNAS* **99**, 12883-12888.
- Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J. R., Wu, C. T., Bender, W. y Kingston, R. E.** (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* **98**, 37-46.
- Shearn, A.** (1989). The ash-1, ash-2 and trithorax genes of *Drosophila melanogaster* are functionally related. *Genetics* **121**, 517-25.

- Siegel, R. M.** (2006). Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* **6**, 308-17.
- Siegel, V., Jongens, T. A., Jan, L. Y. y Jan, Y. N.** (1993). pipsqueak, an early acting member of the posterior group of genes, affects vasa level and germ cell-somatic cell interaction in the developing egg chamber. *Development* **119**, 1187-202.
- Simon, J., Chiang, A. y Bender, W.** (1992). Ten different Polycomb group genes are required for spatial control of the abd-A and Abd-B homeotic products. *Development* **114**, 493-505.
- Simon, J., Peifer, M., Bender, W. y O'Conner, M.** (1990). Regulatory elements of the bithorax complex that control expression along the anterior-posterior axis. *EMBO J.* **9**, 3945-3956.
- Simon, J. A.** (2003). Polycomb group proteins. *Curr Biol* **13**, R79-80.
- Simon, J. A. y Tamkun, J. W.** (2002). Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 210-8.
- Sinclair, D. A., Campbell, R. B., Nicholls, F., Slade, E. y Brock, H. W.** (1992). Genetic analysis of the additional sex combs locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **130**, 817-25.
- Sinclair, D. A., Clegg, N. J., Antonchuk, J., Milne, T. A., Stankunas, K., Ruse, C., Grigliatti, T. A., Kassis, J. A. y Brock, H. W.** (1998). Enhancer of Polycomb is a suppressor of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **148**, 211-20.
- Smith, S. T., Petruk, S., Sedkov, Y., Cho, E., Tillib, S., Canaani, E. y Mazo, A.** (2004). Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. *Nat Cell Biol* **6**, 162-7.
- Smouse, D., Goodman, C., Mahowald, A. y Perrimon, N.** (1988). *polyhomeotic*: a gene required for the embryonic development of axon pathways in the central nervous system of *Drosophila*. *Genes Dev.* **2**, 830-842.
- Soto, M., Chou, T. y Bender, W.** (1995). Comparison of germline mosaics of genes in the Polycomb Group of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **140**, 231-243.
- Sparmann, A. y van Lohuizen, M.** (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 846-56.
- St Johnston, R. D., Hoffmann, F. M., Blackman, R. K., Segal, D., Grimaldi, R., Padgett, R. W., Irick, H. A. y Gelbart, W. M.** (1990). Molecular organization of the decapentaplegic gene in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* **4**, 1114-27.
- Spradling, A. C. y Rubin, G. M.** (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**, 341-7.
- Stankunas, K., Berger, J., Ruse, C., Sinclair, D. A., Randazzo, F. y Brock, H. W.** (1998). The enhancer of polycomb gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein conserved in yeast and mammals. *Development* **125**, 4055-66.
- Stanojevic, D., Small, S. y Levine, M.** (1991). Regulation of a segmentation stripe by overlapping activators and repressors in the iembryo. *Science* **254**, 1385-1387.
- Stanton, S. E., McReynolds, L. J., Evans, T. y Schreiber-Agus, N.** (2006). Yaf2 inhibits caspase 8-mediated apoptosis and regulates cell survival during zebrafish embryogenesis. *J Biol Chem* **281**, 28782-93.
- Stanton, S. E., McReynolds, L. J., Evans, T. y Schreiber-Agus, N.** (2006). YAF2 inhibits caspase 8-mediated apoptosis and regulates cell survival during zebrafish embryogenesis. *J Biol Chem*.
- Struhl, G.** (1981). A gene required for correct initiation of segmental determination in *Drosophila*. *Nature, Lond.* **239**, 36-41.
- Struhl, G.** (1983). Role of the *esc+* gene product in ensuring the selective expression of segment-specific homeotic genes in *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol* **76**, 297-331.
- Strutt, H., Cavalli, G. y Paro, R.** (1997). Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression.

Embo J **16**, 3621-32.

Strutt, H. y Paro, R. (1997). The polycomb group protein complex of *Drosophila melanogaster* has different compositions at different target genes. *Mol Cell Biol* **17**, 6773-83.

Tamkun, J. W., Deuring, R., Scott, M. P., Kissinger, M., Pattatucci, A. M., Kaufman, T. C. y Kennison, J. A. (1992). *brhma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* **68**, 561-72.

Tetsu, O., Ishihara, H., Kanno, R., Kamiyasu, M., Inoue, H., Tokuhisa, T., Taniguchi, M. y Kanno, M. (1998). *mel-18* negatively regulates cell cycle progression upon B cell antigen receptor stimulation through a cascade leading to *c-myc/cdc25*. *Immunity* **9**, 439-48.

Thacker, S. A., Bonnette, P. C. y Duronio, R. J. (2003). The contribution of E2F-regulated transcription to *Drosophila* PCNA gene function. *Curr Biol* **13**, 53-8.

Tie, F., Furuyama, T. y Harte, P. J. (1998). The *Drosophila* Polycomb Group proteins ESC and E(Z) bind directly to each other and co-localize at multiple chromosomal sites. *Development* **125**, 3483-96.

Tie, F., Furuyama, T., Prasad-Sinha, J., Jane, E. y Harte, P. J. (2001). The *Drosophila* Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. *Development* **128**, 275-86.

Tillib, S., Petruk, S., Sedkov, Y., Kuzin, A., Fujioka, M., Goto, T. y Mazo, A. (1999). Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol Cell Biol* **19**, 5189-202.

Tiong, S., Bone, L. M. y Whittle, J. R. (1985). Recessive lethal mutations within the bithorax-complex in *Drosophila*. *Mol Gen Genet* **200**, 335-42.

Tram, U. R., B. Sullivan, W.,. (2002). Cleavage and gastrulation in *Drosophila* embryos.: Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group.

Trimarchi, J. M., Fairchild, B., Wen, J. y Lees, J. A. (2001). The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1519-24.

van Lohuizen, M. (1999). The trithorax-group and polycomb-group chromatin modifiers: implications for disease. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 355-61.

Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E. y Workman, J. L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* **20**, 1899-910.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S. y Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**, 873-8.

Wang, J., Lee, C. H., Lin, S. y Lee, T. (2006). Steroid hormone-dependent transformation of polyhomeotic mutant neurons in the *Drosophila* brain. *Development* **133**, 1231-40.

Wang, J., Tie, F., Jane, E., Schumacher, A., Harte, P. J. y Magnuson, T. (2000). Mouse homolog of the *Drosophila* Pc-G gene *esc* exerts a dominant negative effect in *Drosophila*. *Genesis* **26**, 67-76.

Wang, L., Brown, J. L., Cao, R., Zhang, Y., Kassis, J. A. y Jones, R. S. (2004). Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell* **14**, 637-46.

Weber, U., Siegel, V. y Mlodzik, M. (1995). *pipsqueak* encodes a novel nuclear protein required downstream of seven-up for the development of photoreceptors R3 and R4. *Embo J* **14**, 6247-57.

White, R. A. y Wilcox, M. (1984). Protein products of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cell* **39**, 163-71.

Xu, T. y Rubin, G. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237.

Yamamoto, Y., Girard, F., Bello, B., Affolter, M. y Gehring, W. J. (1997). The cramped gene of *Drosophila* is a member of the Polycomb-group, and interacts with *mus209*, the gene encoding Proliferating Cell Nuclear Antigen. *Development* **124**, 3385-94.

Zavortink, M. y Sakonju, S. (1989). The morphogenetic and regulatory functions of the *Drosophila* Abdominal-B gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters. *Genes Dev.* **3**, 1969-1981.

Zhang, H., Azevedo, R. B., Lints, R., Doyle, C., Teng, Y., Haber, D. y Emmons, S. W. (2003). Global regulation of Hox gene expression in *C. elegans* by a SAM domain protein. *Dev Cell* **4**, 903-15.

Zhang, K., Lin, W., Latham, J. A., Riefler, G. M., Schumacher, J. M., Chan, C., Tatchell, K., Hawke, D. H., Kobayashi, R. y Dent, S. Y. (2005). The Set1 methyltransferase opposes Ipl1 aurora kinase functions in chromosome segregation. *Cell* **122**, 723-34.

Zheng, L., Schickling, O., Peter, M. E. y Lenardo, M. J. (2001). The death effector domain-associated factor plays distinct regulatory roles in the nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem* **276**, 31945-52.

Zhou, J., Ashe, H., Burks, C. y Levine, M. (1999). Characterization of the transvection mediating region of the abdominal-B locus in *Drosophila*. *Development* **126**, 3057-65.

Zink, B. y Paro, R. (1989). In vivo binding pattern of a trans-regulator of homoeotic genes in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **337**, 468-71.

The *Drosophila* RYBP gene functions as a *Polycomb*-dependent transcriptional repressor

Fernando Bejarano^{a,1}, Inma González^{a,1}, Miguel Vidal^b, Ana Busturia^{a,*}

^aCentro de Biología Molecular CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^bCentro de Investigaciones Biológicas CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

Received 21 March 2005; received in revised form 7 June 2005; accepted 7 June 2005

Available online 1 July 2005

Abstract

The *Polycomb* and *trithorax* groups of genes control the maintenance of homeotic gene expression in a variety of organisms. A putative participant in the regulation of this process is the murine RYBP (Ring and YY1 Binding Protein) gene. Sequence comparison between different species has identified the homologous gene in *Drosophila*, the *dRYBP* gene. We have investigated whether *dRYBP* participates in the mechanisms of silencing of homeotic genes expression. We first studied its expression by RNA in situ hybridisation and detected *dRYBP* expression ubiquitously and throughout development. Moreover, we generated a polyclonal anti-dRYBP antibody that recognises the dRYBP protein. dRYBP protein is nuclear and expressed maternally and ubiquitously throughout development. To study the transcriptional activity of dRYBP, we generated a fusion protein containing the entire dRYBP protein and the GAL4 DNA binding domain. This fusion protein functions, in vivo, as a transcriptional repressor throughout development. Importantly, this repression is dependent on the function of the *Polycomb* group genes. Furthermore, using the GAL4/UAS system, we have over expressed dRYBP in the haltere and the wing imaginal discs. In the haltere discs, high levels of dRYBP repress the expression of the homeotic *Ultrabithorax* gene. This repression is *Polycomb* dependent. In the wing discs, dRYBP over expression produces a variety of phenotypes suggesting the overall miss regulation of the many putative genes affected by high levels of dRYBP. Taking together, our results indicate that dRYBP is able to interact with PcG proteins to repress transcription suggesting that the dRYBP gene might belong to the *Polycomb* group of genes in *Drosophila*.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: dRYBP; Homeotic genes; Polycomb; Trithorax; GAL4/UAS; Transcriptional repression

1. Introduction

Homeotic genes are required throughout *Drosophila* development (Duncan, 1987; Morata, 1993). They are expressed in spatially restricted domains along the body axis (Akam, 1987; McGinnis and Krumlauf, 1992). Maintenance of their expression pattern requires continuous transcriptional activation in expressing cells and continuous transcriptional repression in non-expressing cells. The maintenance of the activated transcriptional state requires the *trithorax* group of proteins (trxG) whereas the maintenance of the silenced state requires the *Polycomb* group of proteins (PcG) (Jürgens, 1985; Francis and

Kingston, 2001; Kennison, 1995; Simon and Tamkun, 2002). Both trxG and PcG are conserved from worms to mammals, indicating the conservation of the mechanisms of action and highlighting their importance in animal development (Holdeman et al., 1998). All trxG and PcG proteins so far described are ubiquitously expressed and nearly all lack specific DNA binding activity (for a recent review see Ringrose and Paro, 2004). It is not known how these two groups of proteins interact and function to maintain the restricted domains of homeotic gene expression. However, it is known that PcG and trxG function as multimeric, chromatin-associated protein complexes, which interact with specific DNA sequences (Ringrose et al., 2003) at the homeotic genes promoters, the so-called PREs (Polycomb Response Elements) (Chan et al., 1994) and TREs (Trithorax Response Elements) (Tillib et al., 1999), respectively. PcG and trxG protein complexes are

* Corresponding author. Tel.: +34 914 978 499; fax: +34 914 974 799.

E-mail address: abusturia@cbm.uam.es (A. Busturia).

¹ These authors contributed equally to this work.

thought to be targeted to specific DNA sequences through their interaction with PHO (Pleiohomeotic), GAGA factor, Pipsqueak and Zeste proteins, the only PcG and trxG proteins so far described that are able to bind DNA in a sequence specific manner (Brown et al., 1998; Horard et al., 2000; Huang et al., 2002; Mulholland et al., 2003). No single DNA-binding protein appears sufficient to recruit PcG complexes in vivo (Horard et al., 2000; Busturia et al., 2001; Hur et al., 2002; Mahmoudi et al., 2003; Mohd-Sarip et al., 2002). It has been proposed that the recruitment of PcG and trxG complexes to DNA might be mediated by a collection of sites for multiple and cooperating DNA-binding proteins (Poux et al., 2001a).

Two different PcG complexes have been identified in fly embryos: Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) and Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) (reviewed in Otte and Kwaks, 2003; Francis and Kingston, 2001). Both complexes contain protein components that are evolutionarily conserved from flies to humans (Alkema et al., 1997; Ng et al., 1997; Satijn and Otte, 1999). The PRC1 core components include the PcG proteins Polycomb (PC), polyhomeotic (PH), Posterior sex comb (PSC) and Sex comb extra (SCE/dRING1) (Saurin et al., 2001; Francis et al., 2001). The core components of PRC2 include the PcG proteins, ESC (Extra sex comb), E(Z) (Enhancer of zeste) and Su(z)12 (Suppressor of zeste) (Tie, 2001; Ng et al., 2000; Tie et al., 2003).

Differences in composition as well as in temporal expression suggest that PRC1 and PRC2 serve different functions (Cao et al., 2002; Czermin et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002; Muller et al., 2002). A number of additional PcG and non-PcG proteins interact with both complexes and it is not clear whether these proteins should be considered part of the PRC1 and PRC2 core complexes (Otte and Kwaks, 2003). For example, the only PcG protein known to bind DNA in a sequence specific manner, PHO (Brown et al., 1998), appears to interact transiently with both complexes in a developmentally regulated fashion (Poux et al., 2001a,b). Non-PcG proteins interacting with PRC1 and PRC2 include TBP-associated factors (Trimarchi et al., 2001) and also the histone deacetylases which have been shown to be essential factors for PcG silencing activity (Tie et al., 2003).

Many genetic and molecular screenings have been performed to identify genes involved in the maintenance of homeotic gene expression (among others, Jürgens, 1985; Kennison and Tamkun, 1988; Brown et al., 1998; Gildea et al., 2000). A yeast two-hybrid screen designed to isolate binding partners to the murine Ring1 protein, identified the Ring and YY1 Binding Protein (RYBP), a putative murine Polycomb group protein (Garcia et al., 1999). Whole mount in situ hybridisation to mouse embryos shows that RYBP is expressed ubiquitously in nearly all embryonic tissues. The RYBP protein has been shown (Garcia et al., 1999) to interact with the mouse *Polycomb* Group proteins—RING1A, YY1 and M33 (the homologous of the *Drosophila*

SCE, PHO and PC proteins, respectively). As a result, RYBP has been proposed to be a murine PcG gene. Consistent with this proposition, a GAL4DNA-binding domain–murine RYBP fusion protein (GAL4DB–RYBP) acts as a transcriptional repressor in reporter gene co-transfection assays in mouse cells (Garcia et al., 1999).

Comparison of the murine RYBP gene sequence to the sequence of the *Drosophila* genome (Adams et al., 2000) identified a homologous *Drosophila* gene, which we call *dRYBP*. We have studied the *dRYBP* pattern of expression, the in vivo transcriptional activity of a GAL4DB–*dRYBP* fusion protein in the presence and in the absence of PcG protein function and the phenotypical consequences of over expressing *dRYBP* in different tissues. Our results strongly suggest that *dRYBP* functions together with the PcG proteins in *Drosophila* and therefore might belong to the *Polycomb* group of genes.

2. Results

2.1. The *Drosophila* RYBP (*dRYBP*) gene

The *Drosophila* genome contains a single gene homologous to mouse RYBP (CG12190 *Drosophila* Flybase, <http://flybase.bio.indiana.edu>). The *dRYBP* gene is located in region 58F7 of chromosome 2R (Adams et al., 2000). The genomic structure of the *dRYBP* gene, as well as a comparison of the protein sequences and domain structures of the RYBP family proteins are shown in Fig. 1. The *dRYBP* protein is predicted to contain 150 amino acids. The N-terminal domain contains a C₂–C₂ Zn finger motif of the nucleoporin type, a motif associated with protein–protein interactions (Meyer et al., 2000). The C-terminal has no homology with any described motifs. The RYBP proteins exhibit a high degree of sequence conservation both in the N-terminus and in C-terminus domains. The N-termini show 72% identical and 80% similar residues; the C-termini are 70% identical and 80% similar. Related genes include the human RYBP/YEAF1 (Sawa et al., 2002) and the YAF2 murine and human genes (Kalenik et al., 1997). Finally, the mosquito *Anopheles gambiae* (Fig. 1) and the worm *Ciona ascaralis* also contain genes similar in sequence to *dRYBP*.

2.2. *dRYBP* pattern of expression

The RNA expression pattern of *dRYBP* in embryos and imaginal discs was determined by whole mount RNA in situ hybridisation. Sense and antisense RNA probes were generated covering the entire *dRYBP* cDNA sequence (LD18758, *Drosophila* Flybase, <http://flybase.bio.indiana.edu>). *dRYBP* shows strong and ubiquitous expression in very early embryos, suggesting that the gene is maternally expressed (Fig. 2A). This strong expression is not due to background because hybridisation with the sense RNA probe shows no signal (data not shown). As embryonic

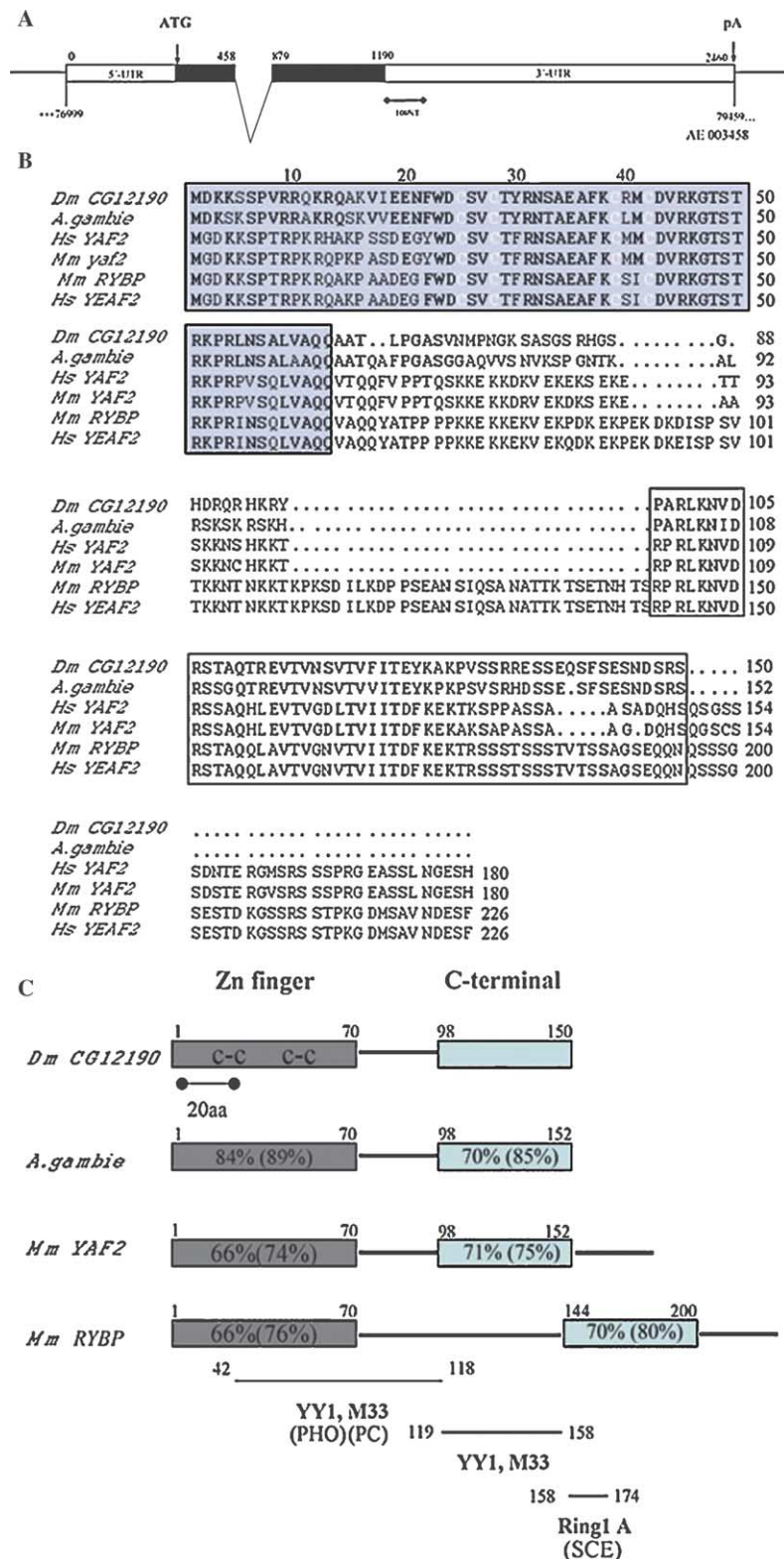


Fig. 1. The *Drosophila* dRYBP gene and protein. (A) Structure of the dRYBP gene (CG12190). AE refers to the contig number of the *Drosophila* Genome Project and pA indicates the location of the polyadenylation site. Non-coding and coding regions of the gene are shown by open and black boxes, respectively. (B) Alignment of the conserved N-terminal (blue box, cysteines of the Zinc Finger indicated in white, identical residues in bold) and C-terminal (open box) domains of the *Drosophila*, *Anopheles*, murine (YAF2 and RYBP) and human (YAF2 and YEA2/RYP) homologs. (C) Schematic representation of the *Drosophila*, *Anopheles*, murine and human RYBPs, indicating the percentage of identical and similar (in brackets) residues compared to the *Drosophila* sequence. Numbers refer to positions of amino acids. Shown below are locations of the domains known to interact in mouse with the YY1, M33 and RING1A and in brackets the homologous proteins in *Drosophila*.

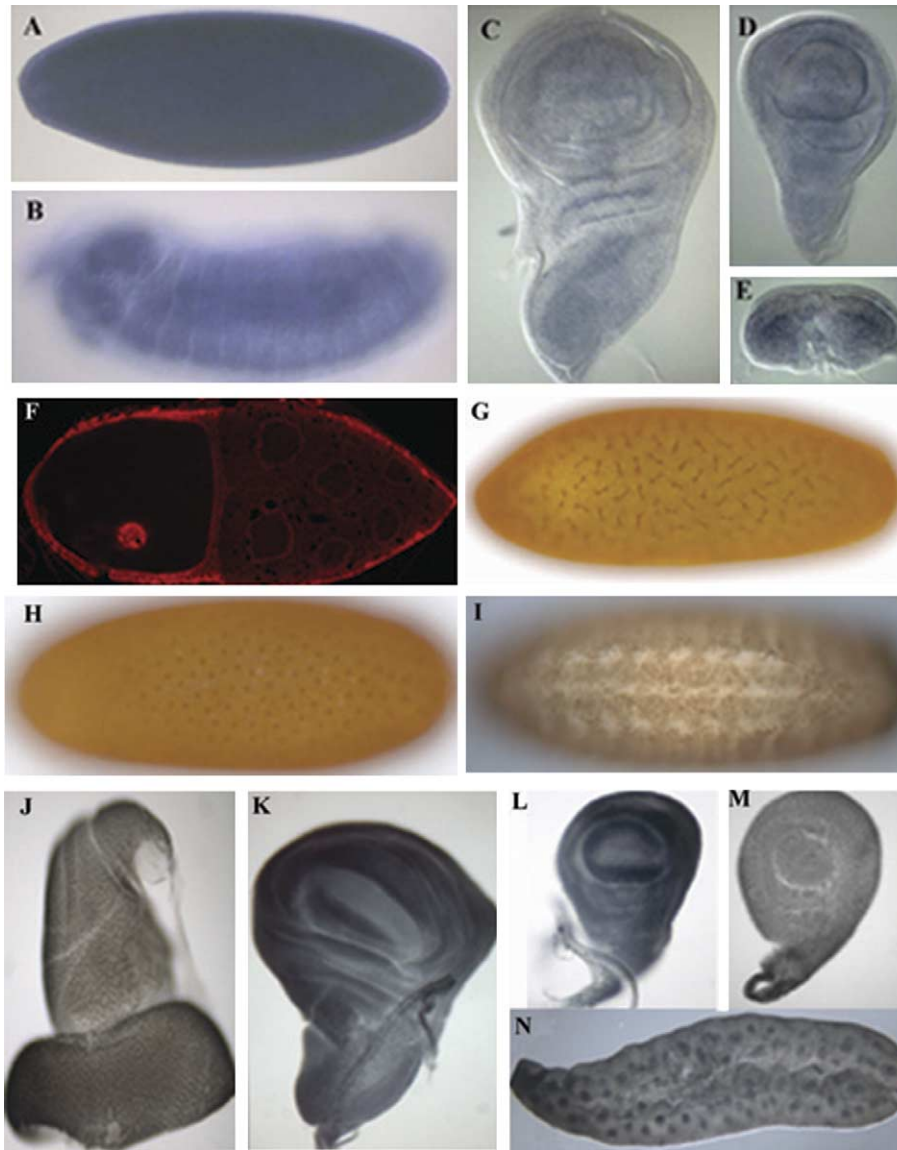


Fig. 2. Expression of dRYBP. A–E: in situ hybridisation using an antisense RNA probe derived from a full-length dRYBP cDNA (A) Early embryo showing strong and ubiquitous expression (B) A stage14 embryo showing ubiquitous expression. Wing (C), haltere (D) and genital (E) imaginal discs showing uniform expression. F–N: anti-dRYBP antibody expression. (F) egg chamber showing the expression (red) in the nucleus of the oocyte. (G) dRYBP protein expression at the syncytial blastoderm embryos showing the staining during mitosis. (H) dRYBP nuclear expression in the syncytial blastoderm embryo (I) ubiquitous expression in an stage 14 embryo (J) eye-antenna disc (K) wing disc (L) haltere disc (M) third leg disc (N) salivary gland.

development proceeds, expression remains ubiquitous but decreases in intensity (Fig. 2B). Eye-antenna, wing, haltere, leg and genital third instar imaginal discs all show ubiquitous expression (Fig. 2C–E).

We additionally raised an anti-dRYBP polyclonal rabbit antibody that recognises a 16 KD band in third instar larvae whole extracts westerns (data not shown) corresponding to the predicted molecular weight of the dRYBP protein. This antibody was used to study the dRYBP expression pattern. dRYBP is nuclear and is expressed in the adult ovaries (Fig. 2F) and ubiquitously in the majority of the tissues throughout embryonic (Fig. 2G–I) and imaginal development (Fig. 2J–N).

2.3. Transcriptional activity of dRYBP

To investigate the transcriptional function of dRYBP, we generated a fusion gene (hs-GALDB–dRYBP, Fig. 3) containing the full-length dRYBP sequence fused to the GAL4 DNA binding domain (GALDB) (Keegan et al., 1986) and placed under the control of the *hsp70* promoter. We analysed the transcriptional effect of this fusion protein using two different reporter genes.

The first reporter gene—BGUZ (Muller, 1995)—contains the GAL4 binding sites (GALBS) and the *lacZ* gene under the control of the *Ultrabithorax* proximal promoter (*Ubxpp*) and the BXD embryonic enhancer (Fig. 3; Muller, 1995).

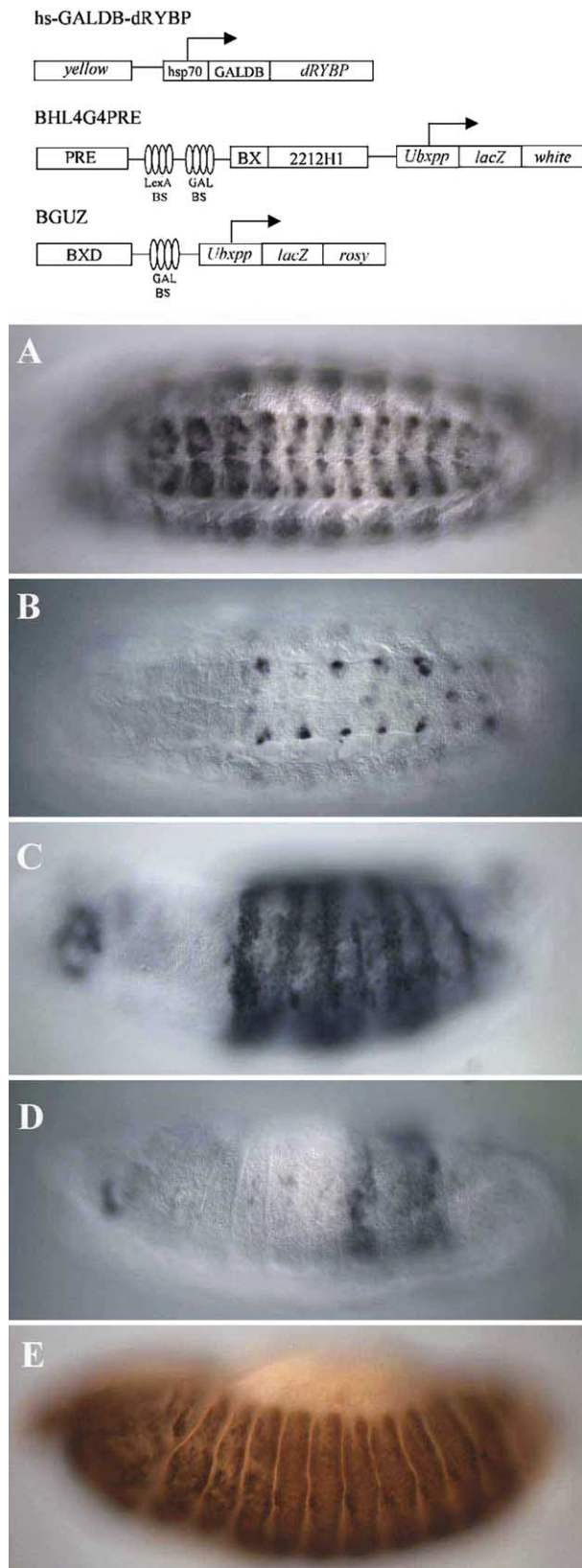


Fig. 3. Over expression of GALDB-dRYBP during embryogenesis. Above, schematic drawings of the hs-GALDB-dRYBP, BHL4G4PRE and the BGUZ constructs. Below, *lacZ* embryonic expression. (A) *P[BGUZ]* (B) Heat shocked *P[BGUZ]; P[hs GALDB-dRYBP]* showing repression in the

This reporter is ubiquitously expressed in the embryos (Fig. 3A), but is repressed in a PcG-dependent manner, by the GALDB-PC (Muller, 1995) and GALDB-YY1 (Atchison et al., 2003), two fusion proteins expressing Polycomb and YY1, respectively. The second reporter gene—BHL4G4PRE (Poux et al., 2002)—contains the GALBS, LexA binding site sequences (LexABS) as well as the *lacZ* gene under the control of the *Ubxpp*, the embryonic (BX) and imaginal disc (2212H1) enhancers and a Polycomb Response Element (PRE) (Fig. 3; Poux et al., 2002). These regulatory elements drive *lacZ* expression in ps6 through ps12 in the embryo (Fig. 3C) and imaginal discs (Fig. 4A,B). Additionally, BHL4G4PRE is activated by GALDB-TRX, a trithorax expressing fusion protein (Fig. 3E; Poux et al., 2002).

Transgenic embryos *P[BGUZ]/+*; *P[hs-GALDB-dRYBP]/+* were heat-shocked to induce expression of the fusion protein. The results show that GALDB-dRYBP represses the BGUZ *lacZ* expression in the majority of cells along the anterior–posterior axis (Fig. 3B).

Next, we studied the transcriptional effect of GALDB-dRYBP on the expression of the BHL4G4PRE (Figs. 3 and 4; Poux et al., 2002) reporter gene. This was accomplished by crossing *P[hs-GALDB-dRYBP]* flies with *P[BHL4G4PRE]* flies. The embryonic heat-shocked progeny show a strong repression of *lacZ* expression (Fig. 3D), which is stable until the late stages of embryonic development. In the control experiment for the heat-shock conditions (Fig. 3D), embryos *P[GALDB-TRX]/+*; *P[BHL4G4PRE]/+* show strong activation of the expression anterior to ps6 as previously reported (Poux et al., 2002). Heat-shocked *P[hs-GALDB-dRYBP]/+*; *P[BHL4G4PRE]/+* haltere and third leg imaginal discs also show a repressed pattern of *lacZ* expression in their posterior compartments, which correspond to the ps6 (Fig. 4C,D). Moreover, expression of the *white* gene, included in the construct as a marker for transformation, was also repressed as seen in the eyes of the heat shocked adult flies progeny (Fig. 4E).

As an additional assay of transcriptional activity, flies containing the *P[hs-GALDB-dRYBP]* minigene were crossed with *P[GALBS-lacZ]* (commonly known as UAS-*lacZ*) transgenic flies. Embryos and imaginal discs of the resulting larvae show no *lacZ* expression indicating that GALDB-dRYBP is unable to activate transcription. In contrast, the transcriptional activator fusion protein GALDB-TRX (Poux et al., 2002) is able to activate *lacZ* transcription of the *P[GALBS-lacZ]* construct in embryos and the imaginal discs (data not shown).

All of the reporter gene assays show that GALDB-dRYBP is unable to activate transcription, and are consistent with the conclusion that dRYBP acts as a transcriptional

majority of the epidermal and CNS cells (C) *P[BHL4G4PRE]* (D) Heat-shocked stage 14 *P[hs GALDB-dRYBP]; P[BHL4G4PRE]* embryo showing repression in most of the cells. (E) Control heat-shocked *P[hs GALDB-TRX]; P[BHL4G4PRE]* embryo showing ubiquitous expression.

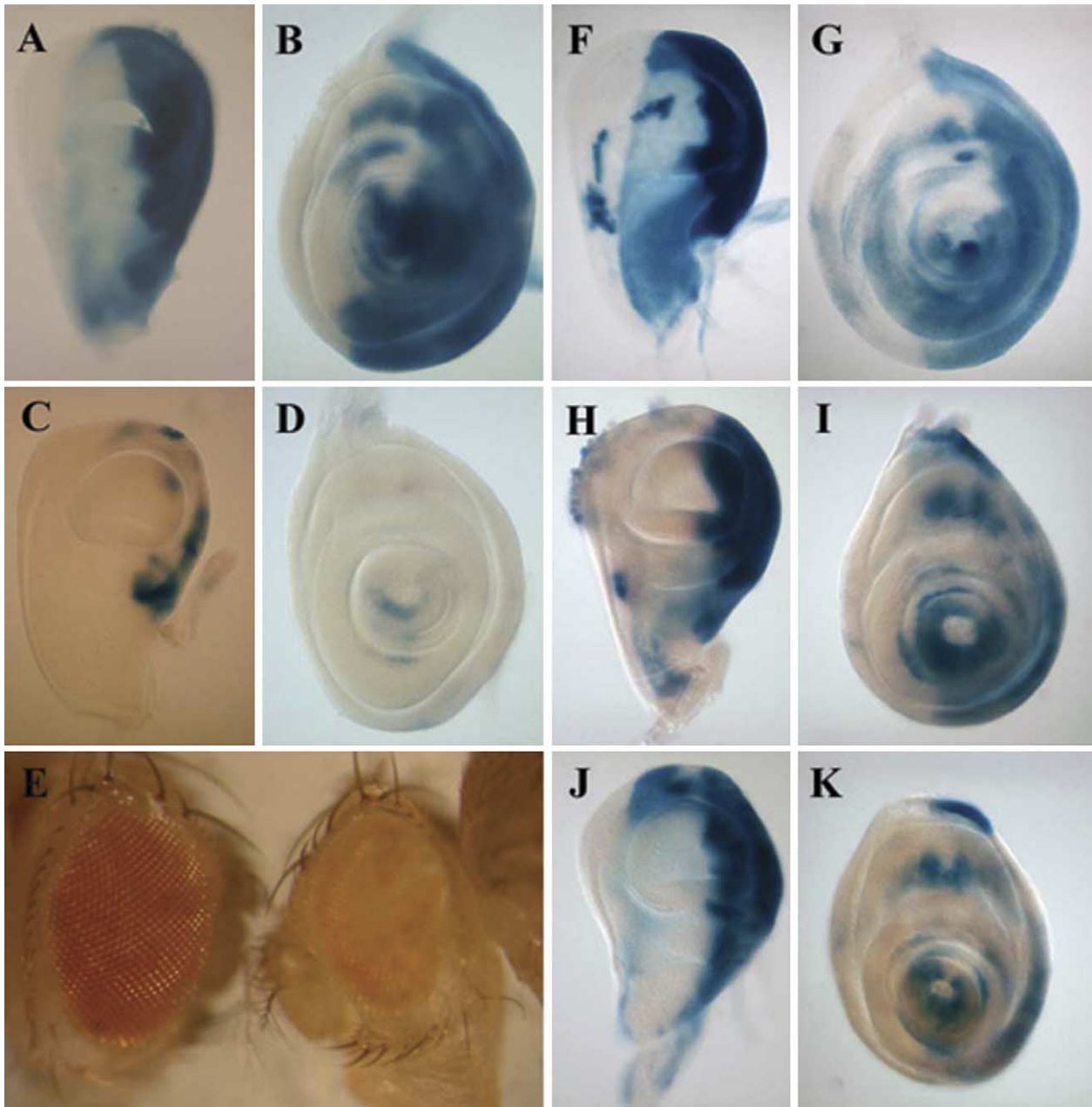


Fig. 4. Over expression of GALDB-dRYBP during imaginal disc development and its dependence on PcG. *P[BHL4G4PRE]* haltere (A) and third leg (B) discs showing expression of *lacZ* in the posterior compartment (ps6). *P[hs GALDB-dRYBP]; P[BHL4G4PRE]* haltere disc (C), third leg disc (D) and heads (E) showing repression of *lacZ* (C,D) and repression of *white* (E) expression. *P[hs GALDB-dRYBP]; P[BHL4G4PRE]* *lacZ* expression in *Pc³/+* haltere (F) and third leg (G) discs, in *Sce¹/+* haltere (H) and third leg (I) discs and in *pho¹/+* haltere (J) and third leg (K) discs.

repressor during embryogenesis and imaginal disc development.

2.4. Transcriptional activity of dRYBP in PcG mutant backgrounds

We next asked if GALDB-dRYBP mediated transcriptional repression was dependent on the PcG proteins. We chose three PcG genes for this analysis: *Pc*, *Sce* and *pho*. Crosses were made between *P[hs-GALDB-dRYBP]/P[hs-*

GALDB-dRYBP]; P[BHL4G4PRE]/P[BHL4G4PRE] flies and *Pc³/TM6B*, *Sce¹/TM6B* and *pho¹/ci^D* flies. The progeny of these crosses were heat-shocked and the expression of *lacZ* studied in the imaginal discs. The effect of the PcG gene mutations on GALDB-dRYBP mediated transcriptional repression is shown in Fig. 4. Control haltere and third leg imaginal discs from the *TM6B* larva (*P[hs dRYBP-GALDB]/+*; *P[BHL4G4PRE]/TM6B*) show repression of *lacZ* expression (Fig. 4C,D). In the haltere and third leg discs of *P[hs dRYBP-GALDB]/+*; *P[BHL4G4PRE]/Pc³*

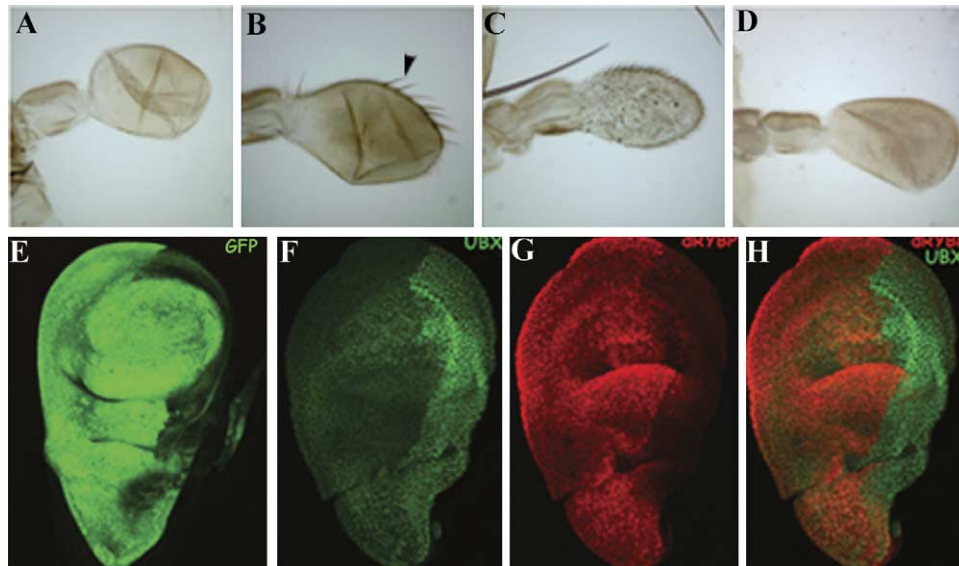


Fig. 5. Over expression of dRYBP in the haltere disc. (A) Wild type haltere (B) *UbxGAL4/+* haltere showing the *Ubx* haploinsufficient phenotype consisting of the appearance of few bristles (arrowhead) (C) *UASdRYBP/+; UbxGAL4/+* haltere covered with wing-like trichomes (D) *UASdRYBP/+; UbxGAL4/Pc³* haltere (E) *UbxGAL4/+; UASGFP* haltere disc showing the domain of GFP expression (green) driven by the *UbxGAL4* line. Note that *UbxGAL4* drives the expression in the majority (but not all) the haltere cells. (F) *UASdRYBP/+; UbxGAL4/+* showing the expression of UBX (green) that is repressed in the *UbxGAL4* expression domain. (G) *UASdRYBP/+; UbxGAL4/+* showing dRYBP expression (red) in the *UbxGAL4* domain. (H) Merged image of *UASdRYBP/+; UbxGAL4/+* haltere disc stained with UBX (green) and dRYBP (red) antibodies.

(Fig. 4F,G), *P[hs dRYBP-GALDB]/+; P[BHL4G4PRE]/+; Sce¹* (Fig. 4H,I), and *P[hs dRYBP-GALDB]/+; P[BHL4G4PRE]/+; pho¹/+* (Fig. 4J,K) larvae, the *lacZ* expression is not repressed. A small amount of repression in the posterior compartment is observed and occasional patches of *lacZ* expression are seen in the anterior compartment of the haltere and leg discs (Fig. 4F,G). Our interpretation of this result is that the single wild-type copy of the *PcG/+* larvae produces a small but sufficient amount of PcG protein to generate some repression in the posterior compartment while, the patches in the anterior compartment are likely due to the effect of the *PcG* mutation on the *P[BHL4G4PRE]* expression. These results show that *GALDB-dRYBP* requires to interact at least with the PC, SCE, PHO proteins to repress transcription.

2.5. Analysis of the phenotypes due to over expression of dRYBP

To study *dRYBP* function in the regulation of homeotic gene expression, we have made use of the *GAL4/UAS* system (Brand et al., 1994) to over express dRYBP in specific domains of the body.

2.5.1. In the haltere imaginal disc

The *Ultrabithorax GAL4 (UbxGAL4)* line was used because it drives expression in the haltere imaginal discs (Fig. 5E; Calleja et al., 1996). This line is an insertion in the *Ubx* gene that generates the haploinsufficient phenotype typical of *Ubx* mutations (Fig. 5B). *UbxGAL4/UASdRYBP* adult halteres show a novel phenotype: although the size of

the haltere seems to be normal (Fig. 5C), the haltere is covered with hairs similar to wing trichomes. This phenotype is suppressed in *Pc³/+* mutant background (Fig. 5D).

This phenotype is suggestive of partial repression of the wild type homeotic *Ultrabithorax* protein (UBX) expression. UBX protein is normally expressed in the haltere and, with the exception of the peripodial membrane cells, not in the wing disc (White and Wilcox, 1984). In *UbxGAL4/UASdRYBP* haltere imaginal discs, we see that UBX expression is repressed (Fig. 5F) in those cells where dRYBP is expressed (Fig. 5G, merged in Fig. 5H). This repression of UBX accounts for the partial transformation towards wing shown by the halteres of the *UbxGAL4/UASdRYBP* flies (Fig. 5C). Moreover, the *scallopedGAL4/+; UASdRYBP/+* halteres show a similar phenotype as described above and the *scallopedGAL4/+; UASdRYBP/+* haltere imaginal discs also show repression of UBX expression in the *scallopedGAL4* driven expression domain (date not shown). These results indicate that over expression of dRYBP has a repressor effect on *Ubx* expression.

2.5.2. In the wing imaginal disc

We next studied the phenotypes produced by dRYBP over expression in the wing imaginal discs, where none of the homeotic Antennapedia and bithorax complex proteins are significantly expressed (Duncan, 1987; McGinnis and Krumlauf, 1992). The lines used—*scallopedGAL4 (sdGAL4)*, *nubbinGAL4 (nubGAL4)*, and *638GAL4*—all direct expression in the wing imaginal disc (Flybase, 1999)

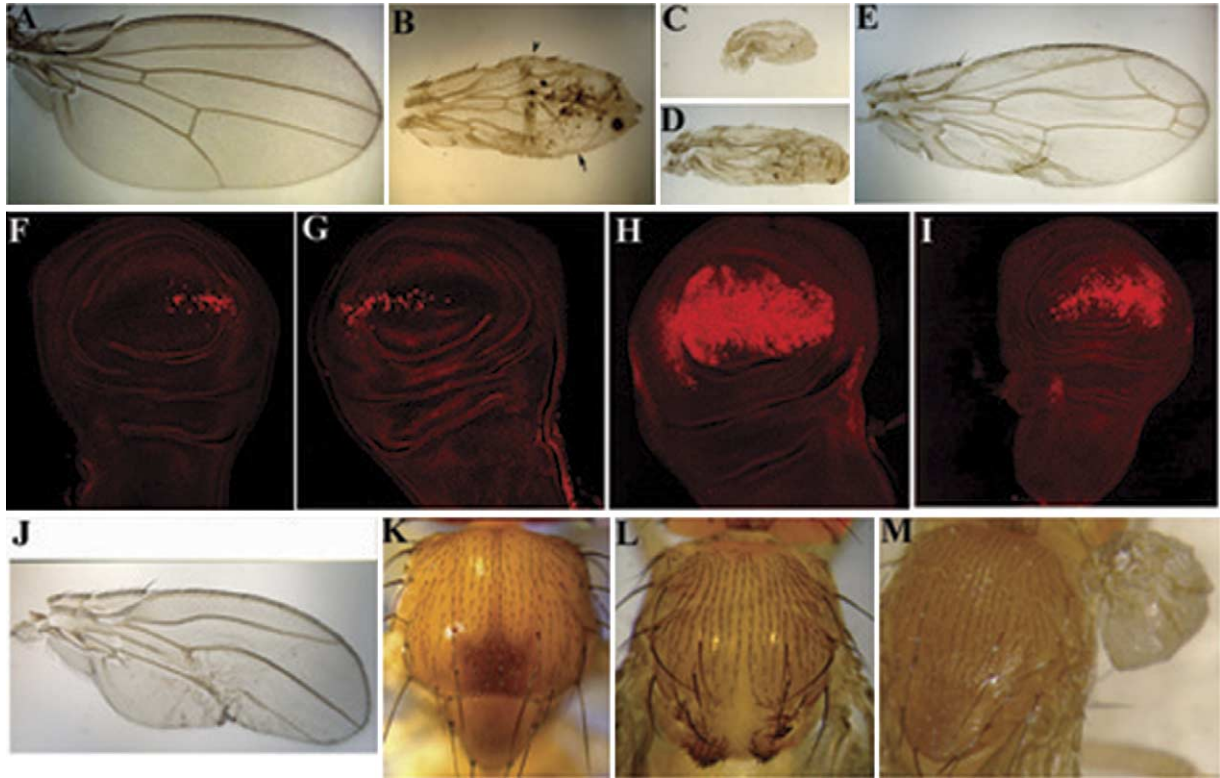


Fig. 6. Over expression of dRYBP in the wing disc. (A) wild type wing (B) *sdGAL4/+; UASdRYBP/+* wing showing many defects: disruption in the formation of the triple row (arrowhead), in the vein pattern and haltere-like trichomes (arrow) (C) *sdGAL4/+; UASdRYBP/+; Pc³/+* wing. Note the reduction in size (D) *sdGAL4/+; UASdRYBP/+; pho¹/+* wing (E) *sdGAL4/+; UASdRYBP/+; trx^{E2}/+* wing, the phenotype is partially rescued. (F–I) Expression of UBX protein in the wing imaginal discs (F) *sdGAL4/+; UASdRYBP/+* (G) *sdGAL4/+; UASdRYBP/+; Pc³/+* (H) *sdGAL4/+; UASdRYBP/+; pho¹/+* (I) *Pc³/+* (J) *enGAL4/+; UASdRYBP/+* wing (K) wild type notum (L) *enGAL4/+; UASdRYBP/+* showing the transformation in the metanotum. (M) *enGAL4/+; UASdRYBP/+* showing wing tissue growing out of the prothorax.

and produce similar phenotypes when they drive dRYBP expression. In general, although with variable expressivity, when dRYBP is over expressed in the wing disc, the resulting adult wings show a range of phenotypes including reduction in the wing size, disruption in the formation of the triple row, malformation of the vein pattern, and trichomes typical of the haltere (Fig. 6B). The appearance of haltere-like trichomes in the wing indicates that over expression of dRYBP produces, among other things, transformation towards haltere. The strongest transformation can be observed in the cases of *sdGAL4/UASdRYBP* (Fig. 6B) and *638GAL4/UASdRYBP* (not shown) wings, indicated by the amount of haltere-like trichomes found in the wing and the reduction of the wing size (Fig. 6B).

The *engrailed* GAL4 (*enGAL4*) line drives expression throughout development in all the posterior compartments. *enGAL4/UASdRYBP* wings show, among others, transformations towards haltere indicated by the kind of trichomes found in the wing blade (Fig. 6J). There are also some transformations indicative of repression of the *engrailed* gene itself (Lawrence and Morata, 1976). In the wing, the vein IV disappears and sometimes first row bristles appear in the posterior compartment of the wing (Fig. 6J). In the notum (Fig. 6L), there is a transformation of the posterior mesonotum

(T2p) towards anterior mesonotum (T2a), which has been previously observed due to inactivation of *engrailed* (Manuel Calleja, personal communication). Moreover, it is also observed that wing tissue grows out of the humerus (Fig. 6M). The same phenotype has been observed in some *trithorax* mutant alleles (Ingham, 1981), but it is not observed when *trithorax* mutant clones are induced throughout larval development (Ingham, 1985), indicating that such transformation is due to lack of *trithorax* at very early stages of development. This transformation is most probably related with the inactivation of some of the *trithorax*-regulated genes, like *engrailed* (Breen et al., 1995).

2.6. Over expression of dRYBP miss regulates the *Ultrabithorax* expression

The phenotypes described above, mainly the haltere-like trichomes found in the wing blade (Fig. 6J) were suggestive of miss regulation of the wild type UBX expression in the wing imaginal disc. We therefore have looked at the Ubx protein expression in the wing discs (White and Wilcox, 1985) of the appropriate GAL4/*UASdRYBP* combinations. We have found that UBX is expressed in the wing discs of *638GAL4/UASdRYBP*, *enGAL4/UASdRYBP*, *nubGAL4/*

UAS*dRYBP* and *sdGAL4/UASdRYBP* larvae (Fig. 6G), accounting for the haltere-like transformations observed in the adult wing of the corresponding flies.

Some of the phenotypes observed in *enGAL4/UAS-dRYBP* adult flies suggested, that the endogenous *engrailed* protein was also being inactivated. We looked at the EN expression in the wing imaginal discs, and we did not detect changes in EN levels of expression. The phenotypes observed due to *dRYBP* over expression could be affecting an engrailed-related gene. However, we do not exclude the possibility that we could have missed a decrease in the EN levels of expression because the adult phenotypes suggesting inactivation of *engrailed* expression show low penetrance rates and are mostly produced when flies are raised at 29 °C.

We next asked whether the miss regulation of the UBX expression in the wing imaginal discs, could be modulated by mutations in the *trithorax* and *Polycomb*-group of genes. To investigate it, we looked at the resulting phenotypes of over expressed *dRYBP* in *PcG* and *trxG* mutant backgrounds. *sdGAL4/+; Pc³/UASdRYBP* wings (Fig. 6C) and *sdGAL4/+; +/UASdRYBP; pho¹/+* wings (Fig. 6D) are strikingly smaller (showing haltere-like features) than in a wild type background (Fig. 6A). Moreover, the *sdGAL4/UAS dRYBP* wing phenotype is rescued in *trithorax* (*trx^{E2}*) mutant background (*sdGAL4/+; trx^{E2}/UASdRYBP*, Fig. 6E). We looked if this modulation was co-related with the levels of UBX expression. As mentioned above, the Ubx protein is not expressed in the cells of the wild type imaginal disc (White and Wilcox, 1985). In *Pc³/+* wing discs (Fig. 6F; Cabrera et al., 1985) and in *pho¹/+* (not shown; Brown et al., 1998) the expression of UBX is consistently confined to small number of cells in the wing pouch (Fig. 6F). Moreover, as shown above, the *sdGAL4/UASdRYBP* wing imaginal discs show expression of UBX in a small number of cells (Fig. 6G). However, the *sdGAL4/UASdRYBP; Pc³/+* or *sdGAL4/UASdRYBP; pho¹/+* (Fig. 6H,I) wing discs show UBX expression in many more cells, once again accounting for the stronger transformation towards haltere observed in the corresponding adult flies (Fig. 6C,D).

3. Discussion

3.1. The *dRYBP* gene

To understand the molecular mechanisms of maintenance of homeotic gene expression, it is important to identify the components of the multimeric protein complexes. A new putative murine PcG component is the RYBP gene (Garcia et al., 1999), whose homologous counterpart in *Drosophila* is the *dRYBP* gene studied in this work (Fig. 1A–C). The mouse homologous gene, RYBP, was identified in a two-hybrid screen for murine Ring1 interacting proteins (Garcia et al., 1999). RYBP family members include the human

YEAFF1 homologous gene and the murine and human YAF2 gene coding for structurally related proteins. Although very similar in sequences, they seem to have different functions as transcriptional regulators of the hGABP gene, i.e. YAF2 positively regulates the transcriptional activity of hGABP but YEAFF1 negatively regulates this activity (Sawa et al., 2002).

We have shown that *dRYBP* is expressed maternally and throughout development in all the nuclei of the embryo and the imaginal discs cells (Fig. 2). The murine RYBP gene is also expressed ubiquitously in the mouse embryo (Garcia et al., 1999). The ubiquitous and nuclear pattern of *dRYBP* expression coincides with the pattern of expression of the *Polycomb* group proteins so far described (Simon, 2003).

3.2. Transcriptional activity of *dRYBP*

We have shown that when *dRYBP* is tethered to DNA sequences, is able to repress, the transcriptional state of minigene reporter constructs (Figs. 3 and 4). Moreover, GALDB-*dRYBP* transcriptional repression function requires the products of at least the *Pc*, *Sce* and *pho* genes (Fig. 4), suggesting that GALDB-*dRYBP* represses transcription by interacting with PcG protein complexes. The PHO protein (homologous to mouse YY1) is able to bind DNA in a sequence specific manner and it has been proposed to recruit the PcG complexes to DNA (Brown et al., 1998). However, our results show that the transcriptional repression function of GALDB-*dRYBP* cannot be achieved in the absence of PHO protein (Fig. 4J,K). Although silencing in these experimental conditions could formally result solely from the interaction of *dRYBP* with PHO, the need of PHO to execute the transcriptional repression may also suggest that in the process of maintenance of homeotic gene expression, the PHO protein serve other functions than the recruitment of PcG complexes to DNA.

Additional evidence for the transcriptional repressor function of *dRYBP* comes from the experiments of over expression of *dRYBP* using the *GAL4/UAS* system. *UbxGAL4/UASdRYBP* halteres show partial transformation towards wing (Fig. 5C) which is correlated with the repression of UBX expression in the haltere imaginal discs due to high levels of *dRYBP* (Fig. 5H). We do not fully understand the partial transformation of the haltere towards wing. We speculate that the over expression of *dRYBP* may also affect genes involved in proliferation that act downstream the *Ubx* gene. The repressive effect is *Polycomb* dependent, suggesting that *dRYBP* transcriptional repression function needs the interaction with *Polycomb* proteins. Moreover, although we have not been able to detect changes in the levels of engrailed expression, some of the phenotypes observed in *enGAL4/UASdRYBP* flies (Fig. 6J–M) are indicative of *engrailed* repression, revealing again the repressor effect of *dRYBP* over expression.

A model has been proposed in which RYBP protein, through its interaction with DNA-binding proteins like YY1, function as a ‘bridge’ to ensure interactions of DNA and non-DNA binding proteins in multimeric protein complexes (Schlisio et al., 2002; Trimarchi et al., 2001). It is not yet known if dRYBP serves a similar bridging function in *Drosophila*. The YY1 protein (homologous to *Drosophila* PHO) is able to bind DNA in a sequence specific manner (Brown et al., 1998) and directly interacts with dRYBP (M. Vidal, unpublished results). We speculate that dRYBP, serves a similar bridging function, bridging between DNA binding proteins like PHO and the multimeric PcG complexes. Further work and mutations in the *dRYBP* gene will be necessary to define whether dRYBP serves this putative bridge function.

3.3. Overall effects due to over expression of dRYBP

dRYBP over expression in the wing produces homeotic and non-homeotic phenotypes indicative of miss regulation of a variety of genes. High levels of dRYBP in the wing (i.e. *sdGAL4/UASdRYBP* flies) produces, among others, transformation towards haltere with the corresponding expression of the Ubx protein in the wing cells, i.e. outside its normal domain of expression. This effect could seem opposite to the repressor effect observed when dRYBP is tethered to DNA (GALDBdRYBP; Figs. 3 and 4) or when dRYBP is over expressed under the control of the *UbxGAL4* line (Fig. 5). However, interference with the assembling/recruiting of the PcG and trxG complexes either because of sequestration of PcG/trxG proteins, perturbation of the PcG/trxG balance or disruption of the cross regulatory interactions between PcG proteins (Ali and Bender, 2004) could perhaps explain the observed expression of UBX protein in the wing disc due to over expression of dRYBP. Alternatively, over abundance of dRYBP or dRYBP containing complexes might lead to a unique target gene repertoire that lead to the effects observed. Finally, the cross regulatory interactions between the genes patterning the wing, that are perhaps being miss regulated by the high levels of dRYBP could also explain the range of phenotypes observed in the wing due to over expression of dRYBP.

In conclusion, our results show that dRYBP protein is nuclear, maternal and ubiquitously expressed throughout development. Our results also show that dRYBP functions, in a *Polycomb* dependent manner, as a transcriptional repressor, suggesting that dRYBP is able to interact with the PcG proteins to repress transcription and therefore might belong to the *Polycomb* group of genes of *Drosophila*. Finally, the study of the multiple phenotypes produced by high levels of dRYBP in the wing might be indicative of the involvement of dRYBP on the regulation of many genes as also described for the PcG genes in *Drosophila*.

4. Experimental procedures

4.1. Fly strains and general procedures

The *P[BHL4G4PRE]*, *P[GALDB-TRX]*, *P[BGUZ]* and *P[GALBS-lacZ]* (or commonly known as *P[UAS-lacZ]*) transgenic flies containing the constructs have been previously described (Muller, 1995; Poux et al., 2002). Details of the construction of the *hsp70-GALDB-dRYBP* and *UAS-dRYBP* constructs are available upon request. *P[hsGALDB-dRYBP]* and *P[UAS-dRYBP]* transgenic flies were obtained by standard procedures using *Df(1)w^{67c23}y-w-* as the host flies. The PcG and trxG mutant alleles *Pc³*, *Sce¹*, *pho¹*, *trx^{E2}* are described (Lindsley and Zimm, 1992). The GAL4 lines used *UbxGAL4*, *enGAL4*, *sdGAL4*, *nubGAL4*, *638GAL4* are all described in (Flybase, 1999). Staining of embryos and imaginal discs with either X-gal or antibodies (Ultrabithorax, 1:20, engrailed, 1:200, dRYBP, 1:100) was performed using standard protocols. The MultAlin program (Corpet, 1988) was used for the alignment of the sequences.

4.2. Whole mount RNA in situ hybridisation

Sense and antisense RNA probes were obtained from the dRYBP cDNA (LD18758, *Drosophila* Flybase, <http://flybase.bio.indiana.edu>) and the labelling, hybridisation and staining procedures were performed following standard protocols (Sullivan et al., 2002).

4.3. Anti-dRYBP antibody production and western blots

The complete dRYBP cDNA sequence was cloned in the pQE vectors (Quiagen) and the recombinant protein expressed and purified following the QIA express protocols. The protein was injected into rabbits and the serum obtained was used as a polyclonal antibody. The specificity of the antibodies was demonstrated by the detection of dRYBP expression in *enGAL4/UAS-dRYBP* embryos. Total extracts from third instar larva were prepared by homogenisation in PBS containing proteases inhibitors. The western blot analysis was performed using standard protocols and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibodies (BioRad) or a chemiluminescence kit (SuperSignal, Pierce) for detection. A band of the expected molecular mass (16 KD) corresponding to dRYBP was detected.

4.4. Over expression experiments

Over expression of GALDB-dRYBP: Transgenic flies *P[hs-GALDB-dRYBP]/P[hs-GALDB-dRYBP]* were crossed to either transgenic flies *P[BGUZ]/P[BGUZ]*, *P[BHL4G4PRE]/P[BHL4G4PRE]* or *P[GALBS-lacZ]/P[GALBS-lacZ]*. Embryos were collected every 60 min and allowed to develop for 60 min. Embryos were heat-shocked at 37 °C for 60 min, allowed to develop until

approximately stage14 (for BHL4G4PRE) or stage18 (for BGUZ) of embryonic development (Campos-Ortega and Hartenstein, 1985) and then fixed prior to proceeding with the staining. The control *P[GAL4DB-TRX]//+; P[BHL4G4PRE]//+* embryos were treated as described above and in Poux et al. (2002). Transcriptional activity of dRYBP during imaginal discs development was analysed using flies *P[hs-GAL4DB-dRYBP]/P[hs-GAL4DB-dRYBP]* crossed to *P[BHL4G4PRE]/P[BHL4G4PRE]* or *P[GALBS-lacZ]/P[GALBS-lacZ]* flies. The progeny were given a series of daily heat shocks by exposing the larval progeny to 37 °C for 60 min each day. Third instar imaginal disc were dissected and X-gal stained according to standard protocols. To study transcriptional repression in a *PcG* mutant background, *P[hs GAL4DB-dRYBP]/P[hs GAL4DB-dRYBP]; P[BHL4G4PRE]/P[BHL4G4PRE]* flies were crossed either with *Pc³/TM6B*, *Sce¹/TM6B*, or *pho¹/ci^D* flies. The larval progeny of these crosses were treated as described above.

Over expression of dRYBP: We used the GAL4/UAS method (Brand et al., 1994) to over express dRYBP. Crosses were established and kept at 25 °C or at 29 °C to allow maximum levels of expression of the GAL4 line.

Acknowledgements

We thank J. Muller, ML. Atchison, V. Pirrota, M. Calleja, E. Sánchez-Herrero and the Bloomington Stock Center for fly stocks; Rob White and PA Lawrence for the Ubx and the engrailed antibody, respectively. Ernesto Sánchez-Herrero and Keith Harshman for critically reading the manuscript. F.B. was a recipient of the FPI fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain. This work was supported by the grants SAF-2001-2211-CO2-01 to M.V and BMC-2001-2178 and BMC-2002-00524 to A.B.

References

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., et al., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195.
- Akam, M.E., 1987. The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* 101, 1–22.
- Ali, J.Y., Bender, W., 2004. Cross-regulation among the *Polycomb* Group genes in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7737–7747.
- Alkema, M.J., Bronk, M., Verhoeven, E., Otte, A., van't Veer, L.J., Berns, A., van Lohuizen, M., 1997. Identification of Bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mammalian polycomb complex. *Genes Dev.* 11, 226–240.
- Atchison, L., Ghias, A., Wilkinson, F., Bonini, N., Atchison, M.L., 2003. Transcription factor YY1 functions as a *PcG* protein in vivo. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 22, 1347–1358.
- Brand, A.H., Manoukian, A.S., Perrimon, N., 1994. Ectopic expression in *Drosophila melanogaster*. In: Goldstein, L., Fyrberg, E. (Eds.), *Practical Uses in Cell and Molecular Biology*. Academic Press, San Diego, CA.
- Breen, T.R., Chinwalla, V., Harte, P.J., 1995. *Trithorax* is required to maintain *engrailed* expression in a subset of *engrailed*-expressing cells. *Mech. Dev.* 52, 89–98.
- Brown, J.L., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, M.L., Kassis, J.A., 1998. The *Drosophila* polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol. Cell.* 1, 1057–1064.
- Busturia, A., Lloyd, A., Bejarano, F., Zavortink, M., Xin, H., Sakonju, S., 2001. The MCP silencer of the *Drosophila* Abd-B gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the maintenance of repression. *Development* 128, 2163–2173.
- Cabrera, C.V., Botas, J., Garcia-Bellido, A., 1985. Distribution of Ultrathorax proteins in mutants of *Drosophila* bithorax complex genes and its transregulatory genes. *Nature* 318, 569–571.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S., Morata, G., 1996. Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* 11, 252–255.
- Campos-Ortega, J.A., Hartenstein, V., 1985. *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Springer, Berlin.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et al., 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science* 298, 1039–1043.
- Chan, C.S., Rastelli, L., Pirrota, V., 1994. A polycomb response element in the Ubx gene that determines an epigenetically inherited state of repression. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 13, 2553–2564.
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16, 881–890.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., Pirrota, V., 2002. *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal polycomb sites. *Cell* 111, 185–196.
- Duncan, I., 1987. The bithorax complex. *Annu. Rev. Genet.* 21, 285–319.
- Flybase, 1999. The Flybase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Res.* 27, 85–88.
- Francis, N.J., Kingston, R.E., 2001. Mechanisms of transcriptional memory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 409–421.
- Francis, N.J., Saurin, A.J., Shao, Z., Kingston, R.E., 2001. Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Mol. Cell* 8, 545–556.
- Garcia, E., Marcos-Gutierrez, C., del Mar Lorente, M., Moreno, J.C., Vidal, M., 1999. RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian polycomb complex, and with the transcription factor YY1. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 18, 3404–3418.
- Gildea, J.J., Lopez, R., Shearn, A., 2000. A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the *Drosophila melanogaster* homologue of human retinoblastoma binding protein 2. *Genetics* 156, 645–663.
- Holdeman, R., Nehrt, S., Strome, S., 1998. MES-2, a maternal protein essential for viability of the germline in *Caenorhabditis elegans*, is homologous to a *Drosophila* polycomb group protein. *Development* 125, 2457–2467.
- Horard, B., Tatout, C., Poux, S., Pirrota, V., 2000. Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3187–3197.
- Huang, D.H., Chang, Y.L., Yang, C.C., Pan, I.C., King, B., 2002. pipsqueak encodes a factor essential for sequence-specific targeting of a polycomb group protein complex. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6261–6271.
- Hur, M.W., Laney, J.D., Jeon, S.H., Ali, J., Biggin, M.D., 2002. Zeste maintains repression of Ubx transgenes: support for a new model of polycomb repression. *Development* 129, 1339–1343.
- Ingham, P.W., 1981. Trithorax: a new homeotic mutation of *Drosophila melanogaster*. *Roux Arch. Dev. Biol.* 190, 365–369.
- Ingham, P.W., 1985. A clonal analysis of the requirement for the trithorax gene in the diversification of segments in *Drosophila*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 89, 349–365.
- Jurgens, G., 1985. A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* 316, 153–155.

- Kalenik, J.L., Chen, D., Bredley, M.E., Chen, S.J., Lee, T., 1997. Yeast two-hybrid cloning of a novel zinc finger protein that interacts with the multifunctional transcription factor YY1. *Nucleic Acids Res.* 15, 843–849.
- Keegan, L., Gill, G., Ptashne, M., 1986. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231, 699–704.
- Kennison, J.A., 1995. The polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Ann. Rev. Genet.* 29, 289–303.
- Kennison, J.A., Tamkun, J.W., 1988. Dosage-dependent modifiers of polycomb and Antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 85, 8136–8140.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D., 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* 16, 2893–2905.
- Lawrence, P.A., Morata, G., 1976. Compartments in the wing of *Drosophila*: a study of the engrailed gene. *Dev. Biol.* 50, 321–337.
- Lindsley, D., Zimm, G., 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, Inc., New York.
- Mahmoudi, T., Zuijderduijn, L.M., Mohd-Sarip, A., Verrijzer, C.P., 2003. GAGA facilitates binding of Pleiohomeotic to a chromatinized polycomb response element. *Nucleic Acids Res.* 31, 4147–4156.
- McGinnis, W., Krumlauf, R., 1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 66, 283–302.
- Meyer, H.H., Shorter, J.C., Seemann, J., Pappin, D., Warren, G., 2000. A complex of mammalian ufd1 and np14 links AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 15, 2181–2192.
- Mohd-Sarip, A., Venturini, F., Chalkley, G.E., Verrijzer, C.P., 2002. Pleiohomeotic can link polycomb to DNA and mediate transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7473–7483.
- Morata, G., 1993. Homeotic genes of *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 606–614.
- Muller, J., 1995. Transcriptional silencing by the polycomb protein in *Drosophila* embryos. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 14, 1209–1220.
- Muller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., et al., 2002. Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* polycomb group repressor complex. *Cell* 111, 197–208.
- Ng, J., Li, R., Morgan, K., Simon, J., 1997. Evolutionary conservation and predicted structure of the *Drosophila* extra sex combs repressor protein. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6663–6672.
- Ng, J., Hart, C.M., Morgan, K., Simon, J.A., 2000. A *Drosophila* ESC-E(Z) protein complex is distinct from other polycomb group complexes and contains covalently modified ESC. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3069–3078.
- Otte, A.P., Kwaks, T.H., 2003. Gene expression by polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 445–454.
- Poux, S., McCabe, D., Pirrotta, V., 2001. Recruitment of components of polycomb group chromatin complexes in *Drosophila*. *Development* 128, 75–85.
- Poux, S., Melfi, R., Pirrotta, V., 2001. Establishment of polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC. *Genes Dev.* 15, 2509–2514.
- Poux, S., Horard, B., Sigrist, C.J., Pirrotta, V., 2002. The *Drosophila* trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing. *Development* 129, 2483–2493.
- Ringrose, L., Paro, R., 2004. Epigenetic regulation of cellular memory by the polycomb and trithorax group proteins. *Annu. Rev. Genet.*
- Ringrose, L., Rehmsmeier, M., Dura, J.M., Paro, R., 2003. Genome-wide prediction of polycomb/trithorax response elements in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Cell* 5, 759–771.
- Satijn, D.P., Otte, A.P., 1999. Polycomb group protein complexes: do different complexes regulate distinct target genes? *Biochim. Biophys. Acta* 1447, 1–16.
- Saurin, A.J., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Kingston, R.E., 2001. A *Drosophila* polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature* 412, 655–660.
- Sawa, C., Yoshikawa, T., Matsuda-Suzuki, F., Delehouzee, S., Goto, M., Watanabe, H., et al., 2002. YEAF1/RYPB and YAF-2 are functionally distinct members of a cofactor family for the YY1 and E4TF1/hGABP transcription factors. *J. Biol. Chem.* 277, 22484–22490.
- Schlisio, S., Halperin, T., Vidal, M., Nevins, J.R., 2002. Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYPB, provides a mechanism for specificity of E2F function. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 21, 5775–5786.
- Simon, J.A., 2003. Polycomb group proteins. *Curr. Biol.* 13, R79–R80.
- Simon, J.A., Tamkun, J.W., 2002. Programming off and on states in chromatin: mechanisms of polycomb and trithorax group complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 210–218.
- Sullivan, W., Ashburner, M., Hawley, R., 2002. *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Tie, F., Prasad-Sinha, J., Birve, A., Rasmuson-Lestander, A., Harte, P.J., 2003. A 1-megadalton ESC/E(Z) complex from *Drosophila* that contains polycomblike and RPD3. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3352–3362.
- Tillib, S., Petruk, S., Sedkov, Y., Kuzin, A., Fujioka, M., Goto, T., Mazo, A., 1999. Trithorax- and polycomb-group response elements within an Ultrathorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5189–5202.
- Trimarchi, J.M., Fairchild, B., Wen, J., Lees, J.A., 2001. The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 1519–1524.
- White, R.A.H., Wilcox, M., 1984. Protein products of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cell* 39, 163–171.
- White, R.A.H., Wilcox, M., 1985. Regulation of the distribution of *Ultrathorax* proteins in *Drosophila*. *Nature* 318, 563–567.